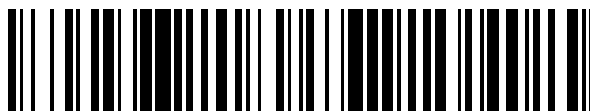


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 873 368**

51 Int. Cl.:

**A61P 17/16** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**A61P 39/06** (2006.01)  
**A61K 36/704** (2006.01)  
**A61Q 19/08** (2006.01)  
**A61K 31/352** (2006.01)  
**A61K 31/7048** (2006.01)  
**A61K 8/97** (2007.01)  
**A61P 17/18** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2013 PCT/MY2013/000033**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14035233**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2013 E 13832854 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021 EP 2895143**

54 Título: **Una composición para el tratamiento de los déficits en el aprendizaje y la memoria**

30 Prioridad:

**29.08.2012 MY PI2012003882**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.11.2021**

73 Titular/es:

**BIOTROPICS MALAYSIA BERHAD (100.0%)  
Lot 21, Jalan U1/19, Hicom Glenmarie Industrial  
Park, 40150 Shah Alam  
Selangor, MY**

72 Inventor/es:

**V. K. GEORGE, ANNIE GEORGE y  
YEE, KAR MING**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 873 368 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Una composición para el tratamiento de los déficits en el aprendizaje y la memoria

### Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición que comprende un extracto de *Polygonum minus*.

### 5 Antecedentes de la invención

El *Polygonum minus* de la familia Polygonaceae se conoce localmente en Malasia como hoja de kesum o laksa. Es una planta medicinal local que se consume comúnmente como ulam para el cuidado preventivo de la salud. Las hojas de la planta son aromáticas y se utilizan popularmente como ingrediente en delicias de Malasia tales como laksa (plato de fideos picantes), kerabu (arroz herbal frito), tom yam (sopa agria condimentada) y asam pedas (curry de tamarindo picante). Las hojas a menudo se cortan en rodajas y se espolvorean por su fuerte aroma y sabor. En el Sistema de Medicina Tradicional de Malasia, la decocción de las hojas frescas de kesum se consume para la indigestión, el estreñimiento y como remedio para los trastornos y el dolor de estómago (Vimala S., Ilham, M.A., Rashih A.A. y Rohana S. (2003). Nature's Choice to Wellness: Antioxidant Vegetables/Ulam. Siri Alam y Rimba 7. Forest Research Institute Malaysia (FRIM), pág. 131) Fengling Pu et al ("Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats", Journal of pharmacological sciences, vol. 104, núm. 4, 01-01-2007, páginas 329-334) describen los efectos diferenciales de los flavonoides sobre la isquemia cerebral mediante la investigación de los efectos del galato de epigallocatequina (EGCG), la catequina, la rutina y la quercetina sobre el deterioro de la memoria espacial y la muerte neuronal inducida por isquemia cerebral repetida en ratas.

20 Sun et al ("Quercetin attenuates spontaneous behavior and spatial memory impairment in d-galactose-treated mice by increasing brain antioxidant capacity", Nutrition Research, Elsevier Inc, vol. 27, núm. 3, 23-03-2007, páginas 169-175) describen los efectos anti-envejecimiento de la quercetina en el cerebro del ratón al investigar si la ingesta a largo plazo de quercetina podría mejorar el comportamiento espontáneo y la memoria espacial en un modelo de envejecimiento de ratón.

25 La piel está sujeta a agresiones por muchos factores extrínsecos (ambientales) así como por factores intrínsecos. A medida que la piel envejece, hay un aumento del estrés oxidativo, un aumento de la inflamación, una disminución de los niveles de colágeno, una expresión anormalmente alta de la enzima MMP (Peptidasa, Metaloproteinasa de Matriz tipo 1), un aumento de la glicación de proteínas y un aumento de la descomposición mitocondrial y por tanto del daño oxidativo.

30 Actualmente existen numerosas composiciones en el mercado para tal prevención y/o tratamiento. Existen muchas combinaciones de diferentes ingredientes en cosmética, tales como antioxidantes, enzimas, fitoestrógenos, emolientes, humectantes y similares. Su capacidad para proteger la piel varía con la composición y sus ingredientes y, por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de una formulación eficaz para uso tópico y/o sistémico a partir de materiales botánicos naturales renovables que se puedan usar, sin receta médica, para tratar el efecto de la oxidación y otros daños cutáneos.

35 Adicionalmente, también es deseable en la técnica explorar otros atributos característicos del material renovable natural aislado, ya que se pueden usar fácilmente con efectos secundarios mínimos o nulos en la humanidad en comparación con las moléculas sintéticas ensayadas y probadas clínicamente, lo que impone graves preocupaciones para la humana y el medio ambiente.

40 Es importante mencionar que generalmente es extremadamente difícil proporcionar un agente eficaz para el cuidado de la piel que posea ambas actividades antioxidantes a través de la propiedad de captación de oxígeno reactivo (ROS) combinada con la actividad anti-colagenasa que inhibe las enzimas responsables de la descomposición del colágeno. En el contexto del desafío existente anterior en la técnica relacionada, se ha descubierto sorprendentemente por medio de la presente invención que el extracto de *Polygonum minus* también conocido como *Persicaria minor* cumple los

### 45 Compendio de la invención

La presente invención se refiere a una composición que comprende un extracto de *Polygonum minus* en cantidades eficaces combinado con o sin otro agente en donde el otro agente es un agente farmacéutico y en donde el extracto comprende quercetin-3-glucurónido y quercitrina en donde el quercetin-3-glucurónido se encuentra en cantidades de 0,5% en peso del extracto de *Polygonum minus* y la quercitrina está en cantidades de 0,2% en peso del extracto de *Polygonum minus* para su uso en el tratamiento de déficits en el aprendizaje y la memoria.

En otra realización de la composición tal como se define anteriormente para su uso en el tratamiento de déficits en el aprendizaje y la memoria, el extracto de *Polygonum minus* tiene valores de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) de entre 11.000 micromoles de TE/gramo y 36.000 micromoles de TE/gramo.

En otra realización preferida de la composición tal como se define anteriormente para su uso en el tratamiento de déficits en el aprendizaje y la memoria, el extracto de *Polygonum minus* tiene un valor de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) de al menos 16000 micromoles de TE/gramo.

5 También se describe un procedimiento para el aislamiento de un extracto activo de *Polygonum minus* que comprende las etapas de a) someter dicho *Polygonum minus* incluyendo partes aéreas de la planta incluyendo tallo y/u hojas a extracción con disolvente preferiblemente con una razón de disolvente a material de 1:10-20 por percolación en un intervalo de temperatura de 70-105°C preferiblemente 80°C para obtener el extracto; y b) filtrar el extracto obtenido de la etapa (a) anterior seguido de concentración y secado que implican liofilización, secado por aspersión o secado con cinta de vacío para obtener del mismo el polvo de extracto seco.

## 10 Breve descripción de las figuras

Las figuras 4 y 5 no forman parte de la invención.

La FIG. 1 ilustra el diagrama de flujo que proporciona el extracto de *Polygonum minus*.

La FIG. 2(a) ilustra los resultados en el histograma de HPLC y la FIG. 2(b) ilustra la comparación de espectros UV de quercetin-3-glucurónido y quercitrina y los picos correspondientes en el extracto.

15 La FIG. 3 ilustra la comparación de la dosis  $CI_{50}$  del extracto con la del conocido antioxidante ácido gálico.

La FIG. 4 ilustra el % de inhibición de colagenasa por el monohidrato de 1,10- fenantrolina patrón (control).

La FIG. 5 ilustra el % de inhibición de colagenasa por el extracto de *Polygonum minus*.

La FIG. 6 ilustra una vista esquemática de segmentos durante la ensayo de sonda de la prueba del Laberinto de Barnes.

20 La FIG. 7(a) ilustra la velocidad en ratones tratados con escopolamina que también recibieron tratamiento con ginkgo y *Polygonum minus* y la FIG. 7(b) ilustra la velocidad en ratones tratados con escopolamina, escopolamina y donepezilo y con vehículo.

La FIG. 8(a) ilustra el estudio de longitud de la trayectoria primaria con escopolamina y ginkgo, escopolamina y *Polygonum minus* (100 mg/kg), escopolamina y *P. minus* (50 mg/kg), escopolamina y vehículo; la FIG. 8(b) ilustra el estudio de la longitud de la trayectoria primaria con control de referencia; la FIG. 8(c) ilustra el estudio de longitud total de la trayectoria con escopolamina y ginkgo, escopolamina y *P. minus* (100 mg/kg), escopolamina y *Polygonum minus* (50 mg/kg), escopolamina y vehículo y la FIG. 8(d) ilustra el estudio de la longitud total de la trayectoria con control de referencia.

25

La FIG. 9 (a) ilustra el estudio de error primario con escopolamina y ginkgo, escopolamina y *Polygonum minus* (100 mg/kg), escopolamina y *Polygonum minus* (50 mg/kg), escopolamina y vehículo; la FIG. 9(b) ilustra el estudio de error primario con control de referencia; la FIG. 9(c) ilustra un estudio de error total con escopolamina y ginkgo, escopolamina y *Polygonum minus* (100 mg/kg), escopolamina y *Polygonum minus* (50 mg/kg), escopolamina y vehículo y la FIG. 9(d) ilustra el estudio de error total con control de referencia.

30

La FIG. 10(a) ilustra el estudio de latencia primaria con escopolamina y ginkgo, escopolamina y *Polygonum minus* (100 mg/kg), escopolamina y *Polygonum minus* (50 mg/kg), escopolamina y vehículo; la FIG. 10(b) ilustra el estudio de latencia primaria con control de referencia; la FIG. 10(c) ilustra un estudio de latencia total con escopolamina y ginkgo, escopolamina y *Polygonum minus* (100 mg/kg), escopolamina y *Polygonum minus* (50 mg/kg), escopolamina y vehículo y la FIG. 10(d) ilustra el estudio de latencia total con control de referencia.

35

La FIG. 11 ilustra el tiempo empleado en segmentos en el grupo tratado con escopolamina y el grupo tratado con *Polygonum minus* a 50 mg/kg y 100 mg/kg.

40

## Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una composición que contiene un extracto de *Polygonum minus* con fines cognitivos. También se divulga el método de obtención de dicho extracto de *Polygonum minus*. Los detalles de la invención y sus ventajas se explican a continuación con mayor detalle con relación a los siguientes ejemplos no limitantes y figuras adjuntas. En lo sucesivo, esta memoria descriptiva describirá la presente invención de acuerdo con las realizaciones preferidas de la presente invención. Sin embargo, se debe entender que el siguiente ejemplo que limita la descripción a las realizaciones preferidas de la invención es simplemente para facilitar la discusión de la presente invención y se prevé que los expertos en la técnica puedan idear diversas modificaciones y equivalentes sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

45

50 Las partes aéreas de las plantas, incluidos el tallo y las hojas, se extraen con agua y se secan en horno con una tasa de extracción de aproximadamente 1:10. La materia prima utilizada son hojas secas con propiedades de 2 a 5 cm de tamaño, no más de 10% de pérdida por secado, no más de 10% de contenido de cenizas, no más de 2% de materia

5 foránea, recuento microbiano aeróbico total de no más de  $10^7$ , recuento de levadura y moho total de no más de  $10^5$ . Las hojas secas se sometieron a continuación a las etapas de percolación utilizando agua purificada y se extrajeron a una temperatura en el intervalo de 70-105°C, preferiblemente a 80°C para obtener el extracto que se filtra, se concentra y se seca adicionalmente usando métodos tales como liofilización, secado por aspersion o secado con cinta de vacío para obtener un polvo de extracto seco que se envasa y almacena. Después de la etapa de secado, el polvo de extracto seco se empaqueta y se almacena a temperatura ambiente según el diagrama de flujo de la FIG. 1.

La identificación y cuantificación de sustancias activas en el extracto y análisis del contenido de humedad de *Polygonum minus* fue estudiado y los resultados se proporcionan a continuación: Se encuentra que el extracto obtenido incluye las sustancias activas quercetin-3-glucurónido y quercitrina según el siguiente ensayo:

10 Ensayo de HPLC: Preparación de la solución de muestra para el análisis de HPLC

1. Se pesan con precisión 100,0 mg de extracto de muestra en un matraz aforado de 5,0 mL y se añade DMSO al volumen.
2. A continuación, la solución se somete a sonicación durante 10 minutos a aproximadamente 60°C, se filtra con un filtro de membrana RC de 0,20 m y se usa como solución de prueba para el análisis por HPLC.

15 Preparación de la fase móvil

1. Canal A - Se añaden 1,0 mL de FA a 1000 mL de agua desionizada. La solución se filtra y se desgasifica.
2. Canal B - Se añaden 1,0 mL de FA a 1000 mL de acetonitrilo.

Sistema cromatográfico (Agilent 1290 Infinity)

<b>Columna:</b>	PhenomenexKinetex (2,1 x 150 mm, 1,7 micras)
<b>Temperatura:</b>	60,0°C
<b>Fase móvil:</b>	Disolvente A - FA al 0,1% en agua Disolvente B - FA al 0,1% en CAN
<b>Velocidad de flujo:</b>	0,400 mL/min (gradiente)

**Sistema de gradiente**

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Disolvente A (%)</b>	<b>Disolvente B (%)</b>
<b>0,00</b>	89,0	11,0
<b>18,00</b>	89,0	11,0
<b>20,00</b>	5,0	95,0
<b>23,00</b>	5,0	95,0
<b>25,00</b>	89,0	95,0

<b>Longitud de onda:</b>	UV a 360 nm, referencia a 450 nm
<b>Tiempo de ejecución:</b>	25 minutos (con 5,0 min post ejecución)
<b>Volumen de inyección:</b>	2,0 µL
<b>Adquisición de datos:</b>	25 minutos

20

Con referencia a la FIG. 2(a), la región resaltada de la izquierda representa la presencia de quercetin-3-glucurónido y quercitrina, respectivamente, en el histograma de HPLC. Adicionalmente, el quercetin-3-glucurónido y la quercitrina se

cuantifican mediante un ensayo de % en dicho extracto final obtenido de *Polygonum minus* en la Tabla 1 a continuación.

#### **Análisis del contenido de humedad**

5 El contenido de humedad del extracto de muestra se determina utilizando un analizador de humedad, en el que se transfieren aproximadamente de 0,5 a 0,6 g de muestra en polvo a una bandeja de aluminio y se calienta a 105°C hasta que se obtiene un peso constante. La pérdida por secado (LOD) está determinada por el porcentaje de pérdida de peso durante el calentamiento frente al peso inicial.

Tabla 1: Cuantificación por HPLC por ensayo de % de Quercetin-3-glucurónido y Quercitrina y análisis del contenido de humedad del extracto.

Ensayo (p/p)%	
Quercetin-3-Glucurónido	0,590818
Quercitrina	0,269141
Contenido de Humedad (%)	5,76

10

Con referencia a la FIG. 2(b), la comparación del tiempo de retención y los espectros UV de quercetin-3-glucurónido y quercitrina con el del extracto de muestra de *Polygonum minus* mostró la presencia de ambos compuestos en dicha muestra. Por lo tanto, tanto el quercetin-3-glucurónido como la quercitrina se identifican positivamente en el extracto de muestra de *Polygonum minus* según los estudios de HPLC anteriores. El extracto de *Polygonum minus* se estudió para revelar actividad antioxidante.

15

#### **Actividad antioxidante de extracto de *Polygonum minus***

El extracto de *Polygonum minus* se probó para determinar su actividad antioxidante utilizando la Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno (métodos ORAC), que se demostró que era muy alta con los valores de ORAC (véanse las tablas a continuación). Basándose en las pruebas realizadas, el extracto de *Polygonum minus* tiene valores preferidos de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) de entre 11.000 micromoles de TE/gramo y 36.000 micromoles de TE/gramo con un valor de ORAC preferido de al menos 16.000 micromoles de TE/gramo. Los altos valores de ORAC producidos en *Polygonum minus* se sometieron a prueba adicionalmente para determinar la capacidad de proteger las células vivas contra el daño oxidativo, mediante el ensayo e-CAP.

20

Tabla 2: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) obtenida de un *Polygonum minus* liofilizado piloto.

	Unidades (μmol TE/gramo)
Poder antioxidante contra los radicales peroxilo	2591
Poder antioxidante contra radicales hidroxilo	8973
Poder antioxidante contra el peroxinitrito	222
Poder antioxidante contra el anión superóxido	4039
Poder antioxidante contra el oxígeno singlete	1139
ORAC total <sub>FN</sub> (Suma de lo anterior)	16964

25

Tabla 3: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) obtenida de *Polygonum minus* liofilizado comercial.

	<b>Unidades (μmol TE/gramo)</b>
Poder antioxidante contra los radicales peroxilo	1979
Poder antioxidante contra radicales hidroxilo	16060
Poder antioxidante contra el peroxinitrito	200
Poder antioxidante contra el anión superóxido	6995
Poder antioxidante contra el oxígeno singlete	1572
ORAC total <sub>FN</sub> (Suma de lo anterior)	26806

Tabla 4: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) obtenida de *Polygonum minus* secado por aspersion piloto.

	<b>Unidades (μmol TE/gramo)</b>
Poder antioxidante contra los radicales peroxilo	2393
Poder antioxidante contra radicales hidroxilo	23020
Poder antioxidante contra el peroxinitrito	228
Poder antioxidante contra el anión superóxido	8272
Poder antioxidante contra el oxígeno singlete	1611
ORAC total <sub>FN</sub> (Suma de lo anterior)	35524

Tabla 5: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) obtenida de *Polygonum minus* liofilizado piloto.

	<b>Unidades (μmol TE/gramo)</b>
Poder antioxidante contra los radicales peroxilo	2013
Poder antioxidante contra radicales hidroxilo	19700
Poder antioxidante contra el peroxinitrito	236
Poder antioxidante contra el anión superóxido	10244
Poder antioxidante contra el oxígeno singlete	1925
ORAC total <sub>FN</sub> (Suma de lo anterior)	34118

Tabla 6: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) obtenida de *Polygonum minus* secado con cinta de vacío piloto con maltodextrina como portador.

	Unidades ( $\mu\text{mol TE/gramo}$ )
Poder antioxidante contra los radicales peroxilo	784
Poder antioxidante contra radicales hidroxilo	6380
Poder antioxidante contra el peroxinitrito	98
Poder antioxidante contra el anión superóxido	3770
Poder antioxidante contra el oxígeno singlete	576
ORAC total <sub>FN</sub> (Suma de lo anterior)	11608

#### Protección antioxidante basada en células en un modelo de eritrocitos (ensayo CAP-e)

5 El ensayo CAP-e (21) como un ensayo de protección antioxidante basado en células que utiliza eritrocitos se desarrolló para abordar la cuestión de si los antioxidantes en productos naturales complejos ingresan al citosol y contribuyen a la reducción del daño oxidativo dentro de la célula. El ensayo mide los efectos solo en el citosol, ya que el tinte indicador que utilizan los autores de la presente invención en la prueba solo es funcional después de penetrar en el espacio intracelular (es decir, el citosol) donde sufre una modificación química, lo que da como resultado su retención dentro de la célula. El ensayo permite la semicuantificación específicamente de aquellos antioxidantes que son capaces de penetrar en células vivas (Honzel et al., 2008. Comparison of Chemical and Cell-Based Antioxidant Methods for Evaluation of Foods and Natural Products: Generating Multifaceted Data by Parallel Testing Using Erythrocytes and Polymorphonuclear Cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry).

10 Para el producto de prueba, se mezclan 0,5 g con 5 mL de solución salina al 0,9% a pH fisiológico. El producto de prueba se mezcla por inversión y a continuación, se agita con vórtex. Los sólidos se eliminan mediante centrifugación a 2400 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante de los productos se elimina y a continuación se filtra para su uso en el ensayo CAP-e. Se preparan diluciones seriadas a partir de cada sobrenadante filtrado en solución salina al 0,9% a pH fisiológico.

15 Los glóbulos rojos se tratan por duplicado con diluciones seriadas de un producto de prueba. Se preparan por hexuplicado muestras de glóbulos rojos sin tratar (controles negativos) y muestras de glóbulos rojos tratados con agente oxidante pero no con un producto de prueba que contenga antioxidantes (controles positivos). Los antioxidantes que no pueden entrar en las células se eliminan mediante centrifugación y aspiración del sobrenadante por encima del sedimento celular.

20 Las células están expuestas al daño oxidativo mediante la adición del generador de radicales libres de peroxilo AAPH. Usando el tinte indicador DCF-DA, que se vuelve fluorescente como resultado del daño oxidativo, se registra el grado de daño antioxidante midiendo la intensidad de fluorescencia de cada muestra de prueba. La inhibición del daño oxidativo se calcula como la intensidad de fluorescencia reducida de las células tratadas con el producto, en comparación con las células tratadas solo con el agente oxidante. El valor de CAP-e refleja la dosis  $CI_{50}$  de los productos de prueba, es decir, la dosis que proporcionó 50% de inhibición del daño oxidativo. Esto a continuación se compara con la dosis  $CI_{50}$  del antioxidante conocido ácido gálico.

25 Con referencia a la FIG. 3 en donde el punto en el gráfico en el que la línea de  $CI_{50}$  de color rojo se cruza con la curva refleja la dosis  $CI_{50}$  del producto de prueba, es decir, la dosis que proporciona 50% de inhibición del daño oxidativo. Esta dosis  $CI_{50}$  se compara con la dosis  $CI_{50}$  del antioxidante conocido ácido gálico (que se utiliza como control en el ensayo), lo que da como resultado un valor de CAP-e expresado en unidades equivalentes de ácido gálico. Se probó el efecto antioxidante del extracto para la protección contra los radicales libres en los glóbulos rojos. El extracto de *Polygonum minus* demostró efectos protectores celulares equivalentes a 55 veces (o posiblemente más de 55 veces) los ácido gálico, por lo que su comparador demostró tener actividades de eliminación de oxígeno reactivo (ROS).

#### Efecto antiarrugas de extracto de *Polygonum minus* (que no forma parte de la invención)

Se probó el efecto antiarrugas del extracto utilizando la prueba anti-colagenasa y MMP-1 y MMP-13 in vitro.

40

Bioensayo de inhibición de colagenasa in vitro (que no forma parte de la invención)

El colágeno es la proteína más abundante en los vertebrados y se encuentra prácticamente en todos los tejidos. Las fibrillas de colágeno son los componentes principales del tejido de soporte de los tejidos conectivos, los cartílagos de los huesos, los dientes y las matrices extracelulares de la piel y los vasos sanguíneos. Existe una relación entre el grosor de la piel y el contenido de colágeno en hombres de todas las edades. Existe una relación similar entre las mujeres mayores de 60 años, pero es menos evidente en las mujeres más jóvenes. En la piel adulta, las características del envejecimiento están estrechamente relacionadas con el contenido total de colágeno, que en ambos sexos disminuye con la edad. El colágeno es degradado por la colagenasa y, por lo tanto, provoca un bajo contenido de colágeno en la piel. Por tanto, una alta actividad colagenasa de la piel puede provocar arrugas en la piel. Los inhibidores del colágeno deberían ayudar a controlar la formación de arrugas en la piel. De particular interés es la relación entre la colagenasa activa y la patología de la artritis reumatoide. Se ha sugerido que la colagenasa normalmente inhibida en las estructuras articulares puede activarse provocando la destrucción de tejido característica en las articulaciones.

Disolventes y reactivos: kit de ensayo de gelatinasa/colagenasa EnzChek™ (E12055, Molecular probes, Invitrogen, EE.UU., Almacenado a -20°C) que contiene: gelatina DQ de piel de cerdo, producto conjugado de flouresceína, tampón de reacción 10X, monohidrato de 1,10-fenantrolina, colagenasa de *Clostridium histolyticum*.

Se prepararon 2.5 mg de muestra disolviéndola en 200 µl de DMSO y se completó hasta 10 mL con tampón de reacción 1X. Se prepararon diluciones adicionales según fue necesario. La escisión enzimática de la gelatina DQ, producto conjugado de flouresceína libera péptido fluorescente. El aumento de la fluorescencia es proporcional a la actividad proteolítica. El producto digerido de gelatina DQ, producto conjugado de flouresceína se excita con luz a 490 nm y la luz emitida a 520 nm se detecta en un lector de placas fluorométrico.

El ensayo de inhibición de colagenasa se llevó a cabo según el prospecto del kit del kit de ensayo de gelatinasa/colagenasa EnzChek™ (E12055, Molecular probes, Invitrogen, EE.UU.). En resumen, se añadieron 80 µl de tampón de reacción 1X/tampón vehículo/solución de prueba/control positivo de varias concentraciones, 100 µl de solución enzimática (0,1 unidades/ml), 20 µl de solución de sustrato (1 mg/ml) y se mezclaron durante 15 s, se incubaron a 25°C durante 2 horas y se leyeron en un lector de microplacas de fluorescencia [Fluostar Optima, BMG Labtech, Alemania] con los siguientes parámetros en donde se excitó a 490 nm, y la emisión a 520 nm fue registrada por el lector de placas fluorométrico Costar 96.

Se llevó a cabo una reacción de control sin que se realizaran el blanco de la muestra, el blanco de control y el blanco del vehículo de las respectivas muestras de prueba (que contenía todos los reactivos excepto las enzimas). El porcentaje de inhibición se calculó como sigue:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{AFU (control)} - \text{AFU (prueba)}}{\text{AFU (control)}} \times 100$$

donde AFU = unidades de fluorescencia arbitrarias y la CI<sub>50</sub> se calculó mediante análisis log-probit.

Material probado	Concentración probada	% inhibición	CI <sub>50</sub> (intervalo de confianza de 95%)
Monohidrato de 1,10-fenantrolina (control positivo) (n = 2)	12,5 µM	0,00	53,19 µM (48,23-58,89)
	25 Mm	11,60	
	50 Mm	40,81	
	100 Mm	88,00	
Extracto liofilizado piloto de <i>P. minus</i>	2,5 µg/ml	4,33	21,13 µg/ml (17,55-25,70)
	5 µg/ml	19,73	
	10 µg/ml	41,74	
	25 µg/ml	56,87	

Material probado	Concentración probada	% inhibición	Cl <sub>50</sub> (intervalo de confianza de 95%)
	50 µg/ml	70,04	
	100 µg/ml	77,04	

La Tabla 7 anterior revela que la concentración del extracto de *P. minus* a 21,13 µg/ml es la concentración inhibidora del 50% de inhibición de la actividad de colagenasa. Adicionalmente, la FIG. 4 y FIG. 5 indican el % de inhibición por el monohidrato de 1,10-fenantrolina patrón y el extracto de *Polygonum minus*.

Peptidasa, metaloproteínasa de matriz tipo 1 (MMP-1)	Especie	n =	Conc.	% inhibición	IC-CE
Extracto piloto liofilizado de <i>P. minus</i>	hum	2	50 mg/mL	110	<5 mg/ml
		2	30 mg/mL	106	
		2	10 mg/mL	101	
		2	5 mg/mL	98	

5

La Tabla 8 anterior revela claramente que el extracto de *Polygonum minus* es eficaz a niveles de 5 mg/ml cuya concentración cuando se aumenta hasta los niveles de 50 mg/ml no cambia mucho el % de inhibición y, por lo tanto, los niveles de 5 mg/ml se consideraron el nivel óptimo para la inhibición máxima.

Peptidasa, metaloproteínasa de matriz tipo 13 (MMP-13)	Especie	n =	Conc.	% inhibición	IC-CE
Extracto liofilizado piloto de <i>P. minus</i>	hum	2	30 mg/mL	102	<5 mg/ml
		2	10 mg/mL	101	
		2	5 mg/mL	100	

10 La Tabla 9 anterior revela claramente que el extracto de *Polygonum minus* es eficaz a niveles de 5 mg/ml cuya concentración cuando se aumenta hasta los niveles de 30 mg/ml no cambia mucho el % de inhibición y, por lo tanto, los niveles de 5 mg/ml se consideraron el nivel óptimo para la inhibición máxima en 100% de MMP-13. Es importante tener en cuenta que, dado que las proteínas MMP de la familia de las metaloproteínasas de matriz (MMP) están implicadas en la descomposición del colágeno en los procedimientos fisiológicos normales y, por lo tanto, evitan la descomposición del colágeno por el extracto de *Polygonum minus*, ralentizan el efecto del envejecimiento ya que las arrugas son causadas por la descomposición del colágeno.

15

Además de eso, se estudió el extracto de *Polygonum minus* para revelar las características de mejora de la cognición.

#### Acción inhibidora in vitro del extracto de *Polygonum minus* sobre la acetilcolinesterasa y la monoamino oxidasa-A

20

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima clave en el sistema nervioso de los animales y se considera el neurotransmisor más importante implicado en la regulación de las funciones cognitivas. Los inhibidores de AChE se encuentran entre los medicamentos clave aprobados por la FDA para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA). Existen varios estudios que relacionan la disminución de la actividad de la colinesterasa cerebral y la mejora de la memoria. El extracto se probó para determinar la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa in vitro.

25

La monoamino oxidasa (MAO) también interviene en la inactivación de neurotransmisores, la disfunción de la MAO (demasiada o muy poca actividad de la MAO) es responsable de una serie de trastornos psiquiátricos y neurológicos. Por ejemplo, niveles inusualmente altos o bajos de MAO en el organismo se han asociado con depresión,

esquizofrenia, abuso de sustancias, trastorno por déficit de atención, migrañas y maduración sexual irregular. Los inhibidores de la monoaminoxidasa son una de las principales clases de fármacos recetados para el tratamiento de la depresión, aunque a menudo se utilizan como tratamiento de última línea debido al riesgo de interacción del fármaco con la dieta u otros fármacos y, de hecho, los inhibidores de la MAO-A actúan como agentes antidepresivos y ansiolíticos.

5

Diana	Especie	n =	Concentración en $\mu\text{g/mL}$	% INH	IC-OE
Colinesterasa, Acetilo, ACES	hum	2	100	68	40,5 $\mu\text{g/mL}$
			30	53	
			10	4	
Monoamino oxidasa MAO-A	hum	2	100	70	38,8 $\mu\text{g/mL}$
			30	44	
			10	23	
Monoamino oxidasa MAO-B	hum	2	100	47	> 100 $\mu\text{g/ml}$
			30	21	
			10	10	
Adenosina A $\mu$	hum	2	100	10	> 100 $\mu\text{g/ml}$
(Control)			30	9	
			10	2	

‡ Parcialmente soluble en disolvente de prueba *in vitro*.  
 \* Se presenta un error típico de la media cuando los resultados se basan en determinaciones múltiples e independientes. hum = humano

La Tabla 10 anterior revela claramente por lo tanto el efecto del extracto de *Polygonum minus* hacia la inhibición de acetilcolinesterasa y MAO-A en donde se encontró que los efectos inhibidores sobre ambas enzimas mencionadas eran comparables mientras que no se encontró que dicho extracto no desempeñara un papel prominente en la inhibición de la monoamino oxidasa MAO-B y la adenosina A $\mu$ .

10

#### Tratamiento con extracto de *Polygonum minus* (*Persicaria minor*) sobre los déficits en el aprendizaje y la memoria inducidos por escopolamina

Los animales se colocan en una plataforma circular elevada y abierta. El animal está expuesto a una luz intensa o a un ruido fuerte. En respuesta a esta intensa estimulación, el animal busca refugio y entra en uno de los orificios alrededor de la plataforma. Aunque el dispositivo fue diseñado originalmente para usarse con ratas, pronto experimentó modificaciones para poder usarse también con ratones. De hecho, el dispositivo se ha considerado apropiado para esta especie debido a su capacidad para encontrar y escapar a través de pequeños orificios.

15

Se sabe que la escopolamina, un antagonista colinérgico muscarínico, causa alteraciones en las pruebas del laberinto de Barnes. Estas alteraciones pueden revertirse aumentando el tono colinérgico mediante la administración de inhibidores de la colinesterasa tales como donepezilo. En el presente estudio, el tratamiento con escopolamina indujo déficits durante la primera parte de la fase de adquisición (aprendizaje) del laberinto de Barnes y se llevó a cabo la prueba de la sonda.

20

Los déficits en el aprendizaje inducidos por la escopolamina se evidenciaron por el aumento de los errores tanto totales como primarios, la latencia total y primaria y la longitud de la ruta total y primaria. Las pruebas de laberintos de Barnes involucran los parámetros que se establecen a continuación.

25

Longitud de la Trayectoria Primaria (cm): La distancia recorrida por el sujeto antes del primer contacto con el orificio de escape. El primer contacto se define como el punto de la nariz que toca el orificio de escape.

Longitud de la Trayectoria Total (cm): La distancia recorrida por el sujeto antes de completar la tarea. La finalización de la tarea se define como la entrada del sujeto en el cuadro de escape. Esto pone fin al ensayo.

5 Errores Primarios: El recuento del número de errores cometidos por el sujeto antes del primer contacto con el orificio de escape. Cualquier contacto de la punta de la nariz con un orificio que no sea de escape se considera un error. Múltiples contactos en el mismo orificio de no escape se cuentan como múltiples errores en este contexto.

10 Errores Totales: El recuento del número de errores cometidos por el sujeto a lo largo de la prueba. Cualquier contacto de la punta de la nariz con un orificio que no sea de escape se considera un error. Múltiples contactos en el mismo orificio que no sea de escape se cuentan como múltiples errores en este contexto.

Latencia Primaria (s): La latencia hasta el primer contacto con el orificio de escape por la punta de la nariz del sujeto.

Latencia Total (s): La latencia para que el sujeto complete la tarea. La finalización de la tarea se define como la entrada del sujeto en la caja de escape, lo que pone fin al ensayo.

15 (i) Artículo de Prueba

20 En este estudio se utilizaron los artículos de ensayo, extracto de *Polygonum minus* propio y extracto de *Ginkgo biloba* comercialmente disponible (extracto comparador). Estos extractos se prepararon y almacenaron para el proyecto según las especificaciones del proveedor. Las dosis del extracto elegido para el estudio fueron identificadas por el proveedor. Se preparó una suspensión de partida 30X cada semana para cada artículo. Esto se dividió en alícuotas en lotes que a continuación se almacenaron a 4°C durante toda la semana. La suspensión de partida se diluyó con agua ultrapura hasta la concentración de trabajo todos los días antes de la dosificación y se desechó después de la dosificación. Se cargaron agujas para sonda oral con las cantidades necesarias de suspensión. Se tuvo cuidado de asegurar la distribución uniforme de las partículas mezclando en vórtice las suspensiones antes de la preparación en jeringas individuales, y también mezclando con jeringa el artículo de prueba diluido. Se ha demostrado previamente que la dosis y el tiempo de administración de escopolamina producen déficits en las tareas de navegación espacial en roedores. La dosis se incrementó de 0,3 mg/kg referidos inicialmente a 0,5 mg/kg, ya que la dosis más alta produciría un déficit más fiable.

(ii) Artículo de Control

El control de vehículo se utilizó según el protocolo de las Tablas 11 y 12 a continuación.

ARTÍCULOS DE CONTROL Y PRUEBA UTILIZADOS				
Ruta	Nombre	Número de código	Dosis	Fuente
p.o. (sonda oral)	Agua ultra pura	N/A	N/A	Cerca Insights
	<i>Ginkgo biloba</i>	DM-0063	50 mg/kg	Biotropics
	<i>P. minus</i>	DM-0064 (P11/RE049/C)	50 mg/kg (dosis baja) 100 mg/kg (dosis alta)	Biotropics
i.p.	Solución Salina al 0,9%	N/A	N/A	Cerca Insights
	Escopolamina	DM-0021	0,5 mg/kg	Sigma
	Donepezilo	DM-0035	1 mg/kg	International Laboratory Company
<b>DESCRIPCIÓN DEL BRAZO</b>				

ARTÍCULOS DE CONTROL Y PRUEBA UTILIZADOS				
Ruta	Nombre	Número de código	Dosis	Fuente
Brazo	Día 1-14	Día 15-19	Expresión	Categoría
1. Control de tratamiento	a. Vehículo por sonda oral	a. Vehículo por sonda oral	Veh/Veh, Veh	
		b. Vehículo i.p. 30 min antes		
		c. Vehículo i.p. 25 min antes		
2. Control de escopolamina	a. Vehículo por sonda oral	a. Vehículo por sonda oral	Veh/Esco, Veh	Control
		b. Escopolamina i.p. 30 min antes		
		c. Vehículo i.p. 25 min antes		
3. Control de referencia	a. Vehículo por sonda oral	a. Vehículo por sonda oral	Veh/Esco, Don	
		b. Escopolamina i.p. 30 min antes		
		c. donepezilo i.p. 25 min antes		
4. Comparador	a. Ginkgo por sonda oral	a. Ginkgo por sonda oral	Gink 50 mg/kg/Esco, Veh	Prueba
		b. Escopolamina i.p. 30 min antes		
		b. Vehículo i.p. 25 min antes		
5. Dosis de prueba 1	a. Producto de dosis baja por sonda oral	a. Dosis 1 por sonda oral	<i>P. min</i> 50 mg/kg/Esco, Veh	
		b. Escopolamina i.p. 30 min antes		
		c. Vehículo i.p. 25 min antes		
6. Dosis de prueba 2	a. Producto de dosis alta por sonda oral	a. Dosis 2 por sonda oral	<i>P. min</i>	
		b. Escopolamina i.p. 30 min antes	100 mg/kg/Esco, Veh	

ARTÍCULOS DE CONTROL Y PRUEBA UTILIZADOS				
Ruta	Nombre	Número de código	Dosis	Fuente
		c. Vehículo i.p. 25 min antes		

**(iii) Animales**

5 Ratonos macho C57BL/6 de 2-6 meses de edad (20-25 g), (n = 12 a 14) fueron suministrados por BioLASCO (Taiwán). Se alojaron en un sistema IVC (Allentown, EE. UU.) En un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h (200-300 Lux) (luces en 07:00h) con acceso libre a alimentos (Labdiet, comida de laboratorio formulada) y agua y la humedad se mantiene entre 50% y 70%. Los animales totales usados para cada tratamiento se muestran en la Tabla 13 a continuación (sujetos usados para cada brazo en el experimento).

Grupos de tratamiento	
Tratamiento	N
1. Control de tratamiento (vehículo/solución salina, vehículo)	13
2. Control de escopolamina (vehículo/escopolamina, vehículo)	12
3. Control de referencia (vehículo/escopolamina, donepezilo)	14
4. Comparador (Ginkgo 50 mg/kg/Escopolamina, Vehículo)	13
5. Dosis de Prueba 1 ( <i>Polygonum minus</i> 50 mg/kg/escopolamina, vehículo)	14
6. Dosis de Prueba 2 ( <i>Polygonum minus</i> 100 mg/kg/escopolamina, vehículo)	13

10 El tratamiento crónico vía p.o. se realizó con los COMPUESTOS DE PRUEBA (dosis de prueba 1 y 2) según la Tabla 12 y la Tabla 12 anteriores y los ARTÍCULOS DE CONTROL (vehículo y ginkgo) de forma continua durante 19 días. La dosificación se administró diariamente a las 1800 h. Los compuestos se administran por vía oral usando una sonda nasogástrica (20G). El tratamiento crónico vía i.p. se realizó con los ARTÍCULOS DE CONTROL (vehículo, escopolamina y donepezilo) de forma continua durante 5 días durante la prueba del laberinto de Barnes. El tratamiento se administró diariamente a cada sujeto 30 minutos antes de la prueba. Los compuestos se administraron i.p. usando una aguja 27G.

(iv) Procedimiento

20 La evaluación del laberinto de Barnes tomó 5 días para cada sujeto, durante 4 ensayos/día durante 4 días (período de adquisición) y el ensayo de la sonda se llevó a cabo 24 horas después del último ensayo de adquisición. Se realizó un ensayo previo (período de adaptación) antes del inicio del ensayo el día 1 y el día 2. A los sujetos sometidos a prueba se les administraron compuestos de prueba por vía i.p. con agujas 27G, y se les devolvió a sus jaulas de origen durante 30 minutos. La prueba del laberinto de Barnes consistió en tres fases, un período de adaptación, un período de adquisición y un ensayo de sonda. El procedimiento detallado se describe en la siguiente sección.

Cronología del experimento

25 Período de adaptación: Se retiró la cámara y se permitió al sujeto explorar el laberinto durante 30 segundos y a continuación se le guió suavemente hasta el orificio de escape. Si el sujeto no entraba por el orificio de escape, se colocaba dentro. A continuación, se cubrió el orificio y el sujeto permaneció allí durante 3 minutos. A continuación, se devolvió al sujeto a su jaula de origen y se limpió la plataforma con etanol del 70%.

30 Período de adquisición (día 1-4): En este período, se retiró la cámara y se permitió al sujeto explorar el laberinto durante 5 minutos y a continuación se le guió suavemente hasta el orificio de escape. Si el sujeto no entraba por el orificio de escape, se colocaba dentro. A continuación, se cubrió el orificio y el sujeto permaneció allí durante 1 minuto.

Después, se devolvió al sujeto a su jaula de origen y se limpió la plataforma con etanol del 70%. El siguiente ensayo se realizó después de un intervalo entre ensayos de dos minutos.

5 Durante este período, el comportamiento de los sujetos experimentales fue capturado con una cámara de video y grabado en el disco duro de un PC de sobremesa. Se realizó un análisis de estas grabaciones utilizando el sistema de seguimiento EthoVision® XT para el seguimiento y análisis automático del movimiento de los animales. Los parámetros comentados anteriormente se midieron durante la prueba y se procesaron.

10 Para cada parámetro, se promediaron las pruebas de cada día (4 pruebas para cada sujeto de este estudio) y se obtuvo un valor de rendimiento medio de cada sujeto para el día en particular. La media de los cuatro ensayos realizados en cualquier día por un sujeto se toma como una medida, por lo que la *n* para los puntos de datos se basa únicamente en el número del sujeto. Los datos se analizaron adicionalmente utilizando ANOVA de medidas repetidas bidireccionales después de que los datos se sometieran a una prueba de distribución normal, con Día como factor de medida repetida dentro de los sujetos y Grupo entre el factor del sujeto. También se examinó la interacción de factores. Se llevaron a cabo comparaciones post-hoc por pares entre grupos utilizando la prueba de Tukey HSD si se encontró un efecto significativo. Todos los gráficos se representaron como media  $\pm$  ET, el nivel  $\alpha$  se fijó en 0,05 a menos que se indique lo contrario. El análisis de los datos se realizó utilizando el soporte lógico estadístico Sigma Plot.

Ensayo de sonda (día 5): El ensayo de sonda se realizó en las mismas condiciones ambientales que los ensayos de adquisición.

20 Duración en segmentos (s): Los orificios se cierran colocando un disco de color blanco idéntico en el laberinto durante la prueba de la sonda. Los sujetos tienen 90 segundos para explorar el laberinto. La arena se dividió en 8 segmentos exactamente iguales (como se muestra en la Figura 6) y se midió la duración en cada segmento por parte del sujeto usando el soporte lógico de seguimiento de video Ethovision durante la prueba de la sonda. En la prueba de Barnes se anotaron los parámetros y se comentan a continuación.

Período de adquisición (día 1 - día 4)

25 Velocidad: Con referencia a la FIG. 7(a) y FIG. 7(b), el análisis ANOVA de medidas repetidas bidireccionales no reveló ningún efecto significativo del tratamiento sobre la velocidad y, por tanto, la interpretación de las medidas de aprendizaje y memoria no se confunden con los efectos estimulantes o sedantes de los compuestos de prueba.

30 Longitud de la ruta primaria y longitud de la ruta total: Con referencia a la FIG. 8(a), FIG. 8(b), FIG. 8(c) y FIG. 8(d), las figuras muestran que el tratamiento con escopolamina disminuyó el rendimiento sólo el día dos (para la longitud de la ruta primaria) y los días uno, dos y tres (para la longitud total de la ruta) en comparación con el grupo tratado con el control de vehículo. Esta disminución en el rendimiento para la longitud de la trayectoria total demuestra un déficit inducido por escopolamina en el aprendizaje en el laberinto de Barnes. El déficit inducido por escopolamina se observó en los ratones tratados con 50 mg/kg de *Polygonum minus*; mostraron una disminución significativa en el rendimiento en comparación con los ratones tratados con vehículo + vehículo los días dos y tres. Esto sugiere que a esta dosis la dosis de tratamiento con *Polygonum minus* no revierte los déficits inducidos por escopolamina en el laberinto de Barnes. Sin embargo, los ratones tratados con donepezilo, el ginkgo y 100 mg/kg *Polygonum minus* no mostraron un déficit inducido por escopolamina. Su rendimiento no fue significativamente diferente al de los ratones tratados con vehículo + vehículo.

40 Errores primarios y errores totales: Los resultados muestran que la escopolamina indujo un déficit en el aprendizaje el día dos (para errores primarios) y los días uno y dos para errores totales, en comparación con los ratones de control tratados con vehículo. Los déficits de errores totales no se observaron después del tratamiento con *Polygonum minus* a 100 mg/kg, ginkgo o donepezilo durante los días uno y dos, donde había un déficit inducido por escopolamina. Estos datos sugieren que la alta dosis de *Polygonum minus* puede revertir los déficits en el aprendizaje inducidos por escopolamina, evaluados por los errores totales. La dosis más baja de *Polygonum minus* pareció revertir el déficit por escopolamina el día dos, según lo evaluado por los errores primarios en la FIG. 9(a), FIG. 9(b), FIG. 9(c) y FIG. 9(d).

45 Latencia primaria y latencia total: Estos datos muestran que cuando se compara con el control de vehículo, la escopolamina induce un déficit en el aprendizaje. Es decir, los ratones tratados con escopolamina tardan más en encontrar el orificio y escapar del laberinto. Los ratones tratados con la dosis alta de *Polygonum minus* se comportan igual que los ratones tratados con vehículo y no muestran un déficit en el aprendizaje por escopolamina. Se obtiene un resultado similar con el tratamiento con donepezilo y con el tratamiento con ginkgo como se muestra en la FIG. 10(a), FIG. 10(b), FIG. 10(c) y FIG. 10(d).

55 En la prueba de la sonda (Día 5), no se encontraron diferencias significativas en el tiempo empleado en los segmentos en el grupo tratado con escopolamina y el grupo tratado con *Polygonum minus* a 50 mg/kg. La FIG. 10 (Fig. 11) muestra que durante la prueba de la sonda los ratones realizan la tarea pero no hay ningún orificio de escape. A los ratones se les permite explorar el laberinto y se registra el tiempo que los ratones permanecen en varias zonas del laberinto. Esta prueba de "sonda" se utiliza para evaluar la memoria. Los ratones tratados con escopolamina no mostraron preferencia por el segmento 'objetivo' del laberinto, donde, en las pruebas anteriores, estaba ubicado el orificio de escape. Esto sugiere que la escopolamina ha inducido un déficit en la memoria. Este déficit de memoria no se revirtió con la dosis baja de *Polygonum minus*, ya que estos ratones tampoco mostraron preferencia por el segmento

objetivo. Tanto el tratamiento con ginkgo como con donepezilo revirtieron el déficit por escopolamina, efectos que han sido referidos por varios laboratorios. La dosis alta de *Polygonum minus* también revirtió los déficits de memoria inducidos por escopolamina ya que los ratones tratados con extracto de *Polygonum minus* a 100 mg/kg pasaron una cantidad significativa de tiempo en el segmento objetivo.

5 En el presente estudio, el tratamiento con escopolamina indujo déficits durante la primera parte de la fase de adquisición (aprendizaje) del laberinto de Barnes. Los déficits en el aprendizaje inducidos por la escopolamina se evidenciaron por el aumento de los errores tanto totales como primarios, la latencia total y primaria y la longitud de la trayectoria total y primaria. Teniendo en cuenta la curva de aprendizaje, el deterioro de los animales tratados con escopolamina parecía más pronunciado al principio del entrenamiento, después de lo cual se alcanzó cierta constancia  
10 entre los grupos de tratamiento, esto se ilustra mejor por el aumento de la longitud total de la ruta en los ratones tratados con escopolamina los días uno, dos y tres, pero no el día cuatro. Estos déficits fueron atenuados por los controles positivos: donepezilo y extracto de ginkgo. Además, *Polygonum minus* a 100 mg/kg atenuó los déficits inducidos por escopolamina en la fase de adquisición del laberinto de Barnes. Los compuestos de prueba invirtieron los déficits inducidos por escopolamina en el aspecto de retención (ensayo de sonda) de la tarea. En el ensayo de  
15 sonda todos los tratamientos excepto la dosis baja de 50 mg/kg de *Polygonum minus* atenuaron los déficits inducidos por escopolamina. Estos déficits se describieron por no haber pasado un tiempo significativo en el segmento objetivo de los ratones. La falta de efecto de la dosis baja y el efecto significativo de la dosis alta sugerirían que hubo una acción dependiente de la dosis del extracto.

20 Los déficits de aprendizaje por escopolamina estuvieron presentes al principio del experimento y los resultados sugieren que un extracto de *Polygonum minus* puede atenuar estos déficits de memoria y aprendizaje inducidos por escopolamina en ratones. El presente estudio utilizó el laberinto de Barnes que proporciona una evaluación de la memoria espacial.

25 Por tanto, gracias al avance técnico de la presente invención, es posible proporcionar un extracto de *Polygonum minus* también conocido como *Persicaria minor*, con un potencial de prevención del daño oxidativo de las células al tener altos valores de ORAC de al menos 16000 micromoles de TE/gramo de dicho extracto, que exhibe un efecto protector contra las arrugas y el envejecimiento al poseer un fuerte efecto inhibitorio hacia la MMP-1 (Peptidasa, Metaloproteinasa de matriz tipo 1) y MMP-13 (Peptidasa, metaloproteinasa de matriz tipo 13) para prevenir así la descomposición del colágeno; y un beneficio para la cognición a través de la mejora de la memoria y el aprendizaje potencialmente a través del efecto anticolinesterasa del extracto.

30 Así, el extracto de agua de *Polygonum minus* caracterizado por la presencia de marcadores quercetin-3-glucurónido y quercitrina es notablemente eficaz como potenciador cognitivo y es potencialmente activo para el tratamiento de la depresión y la ansiedad al ser un potencial inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa y monoaminoxidasa-A, respectivamente.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende un extracto de *Polygonum minus* en cantidades eficaces combinado con o sin otro agente, en donde el otro agente es un agente farmacéutico y en donde el extracto comprende quercetin-3-glucurónido y quercitrina, en donde el quercetin-3-glucurónido está en cantidades de 0,5% en peso del extracto de *Polygonum minus* y la quercitrina está en cantidades de 0,2% en peso del extracto de *Polygonum minus* para su uso en el tratamiento de déficits en el aprendizaje y la memoria.
- 5 2. La composición según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de déficits en el aprendizaje y la memoria, en donde el extracto de *Polygonum minus* tiene valores de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) de entre 11.000 micromoles de TE/gramo y 36.000 micromoles de TE/gramo.
- 10 3. La composición según la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de déficits en el aprendizaje y la memoria, en donde el extracto de *Polygonum minus* tiene un valor de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) de al menos 16000 micromoles de TE/gramo.

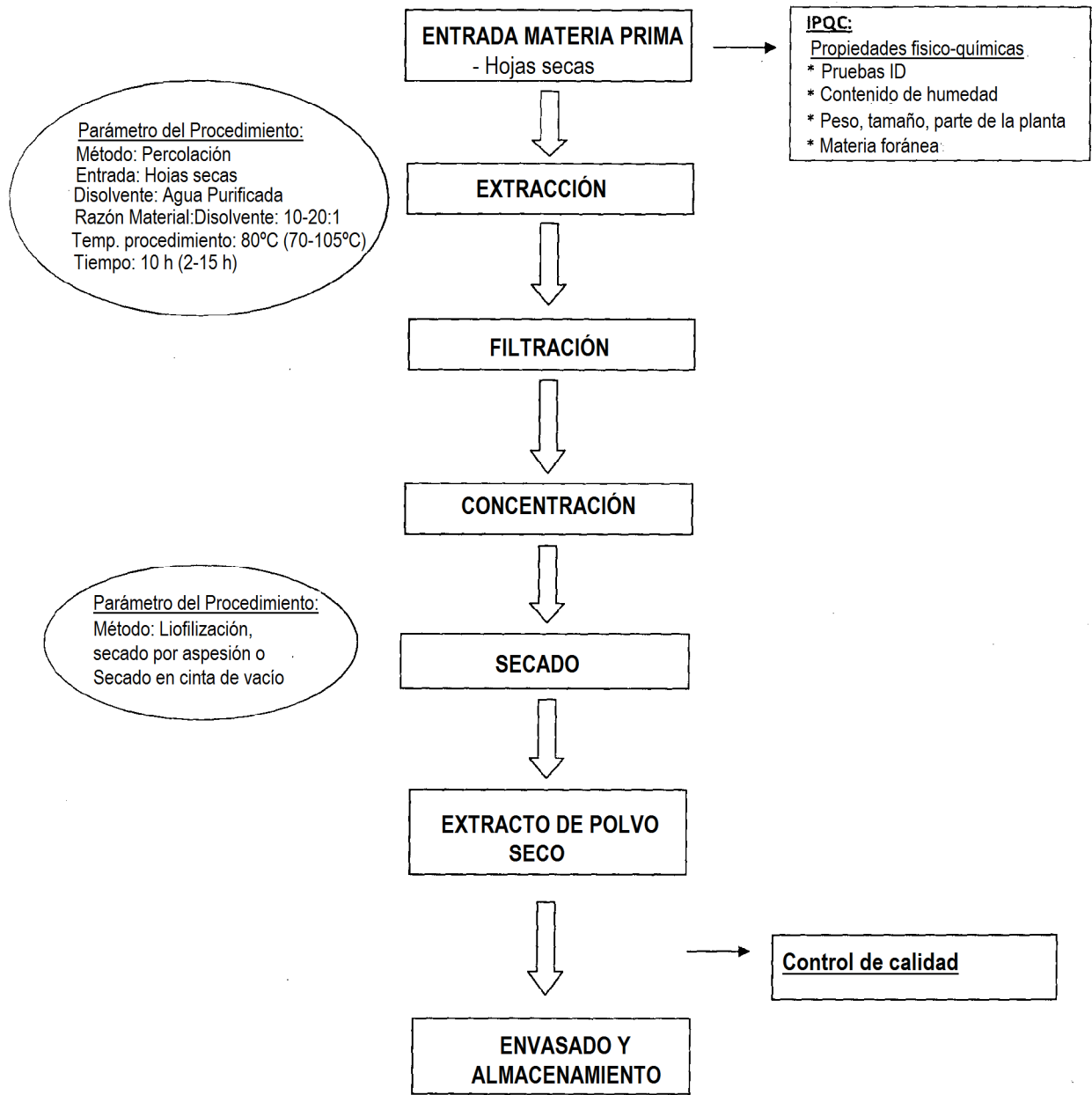


Fig 1

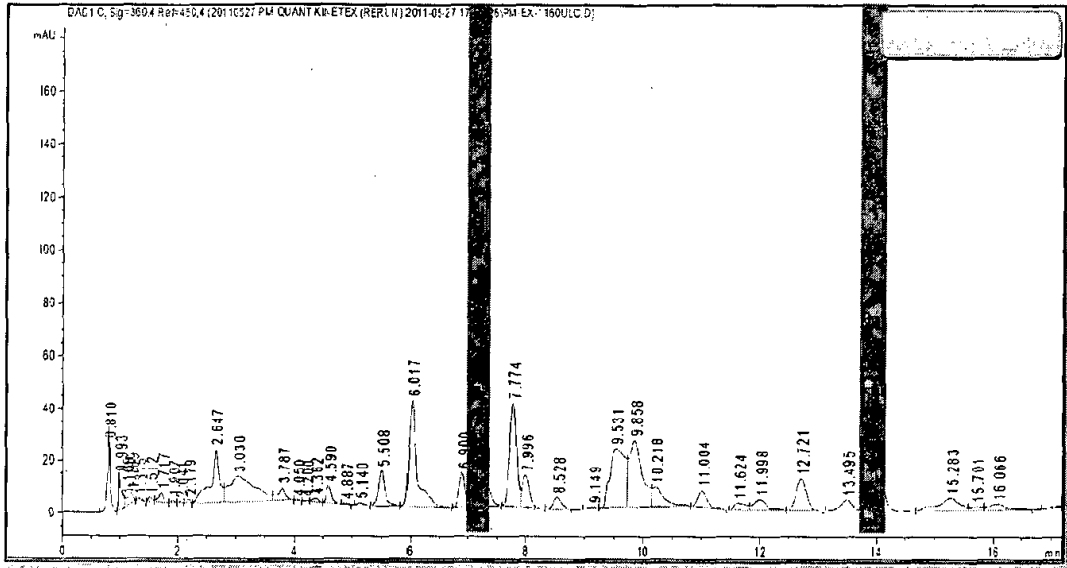


Fig 2a

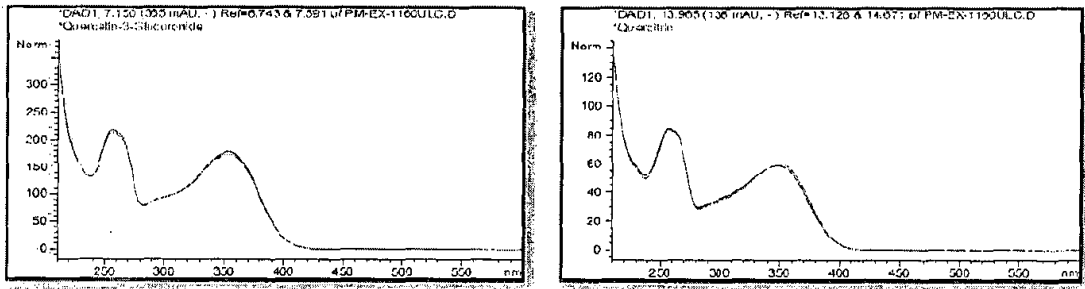


Fig 2b

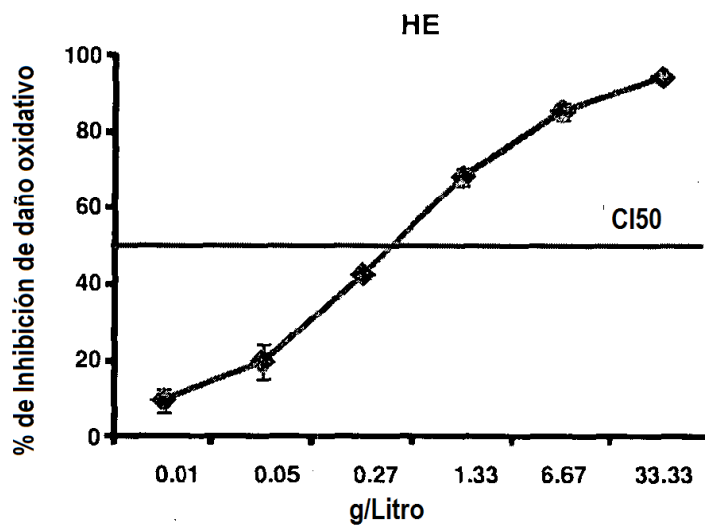


Fig 3

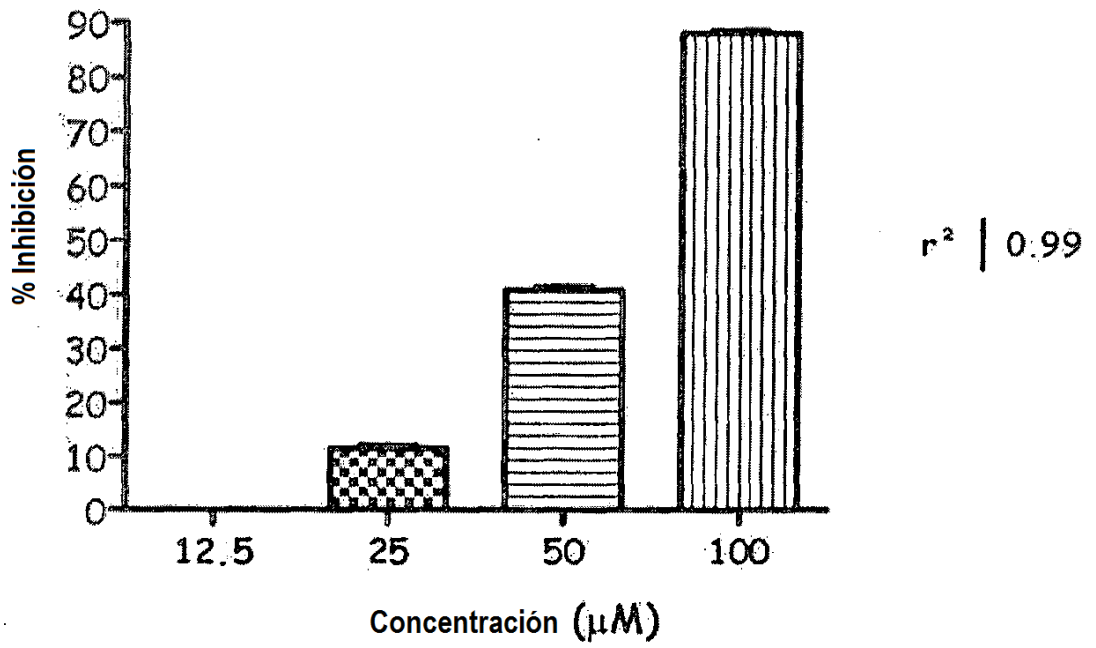


Fig 4

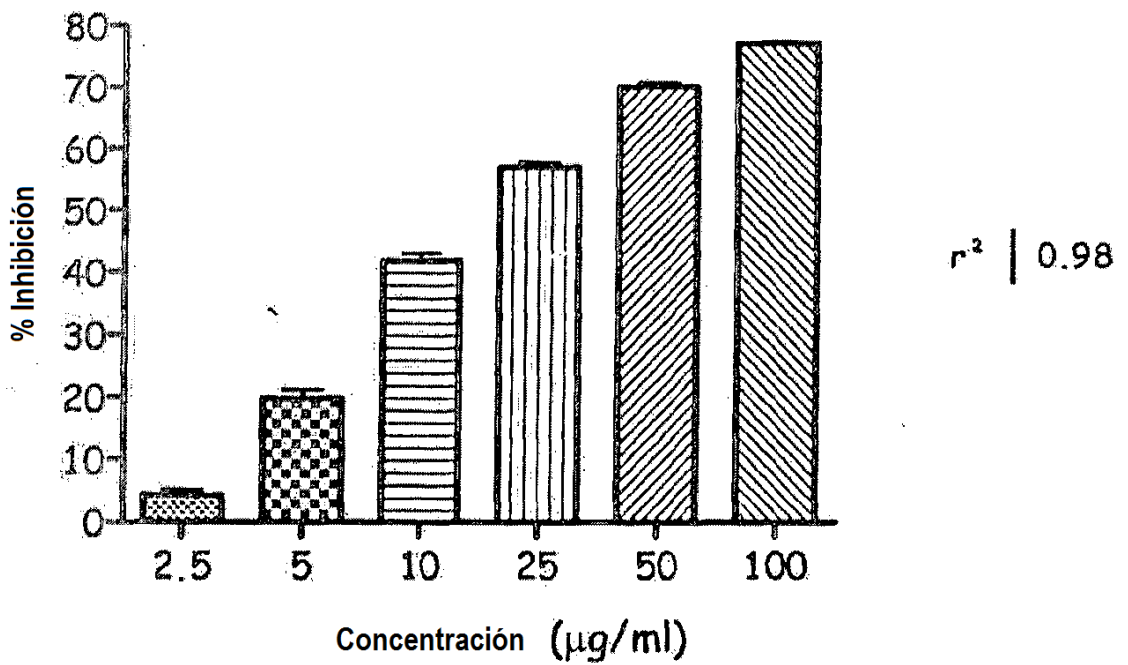


Fig 5

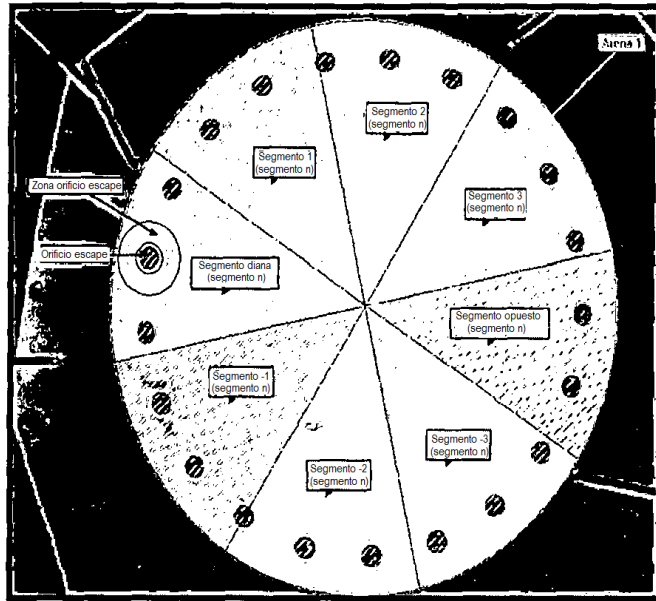


Fig. 6

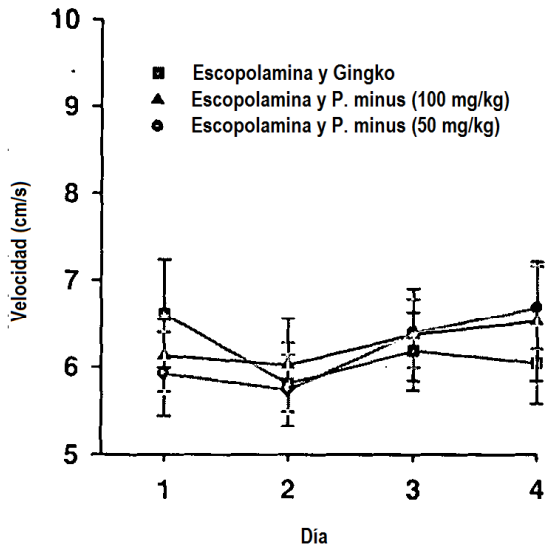


Fig. 7a

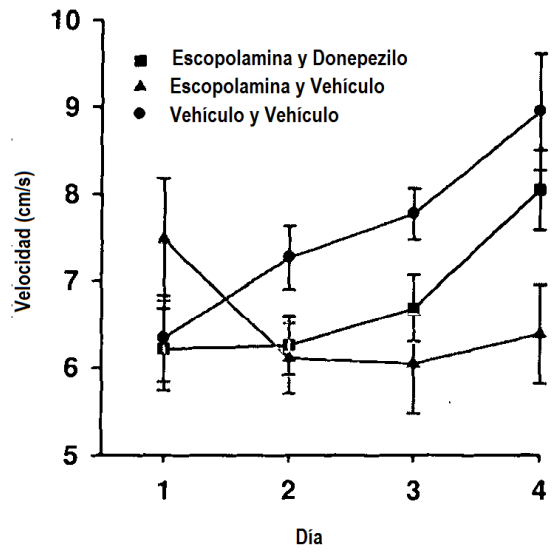


Fig. 7b

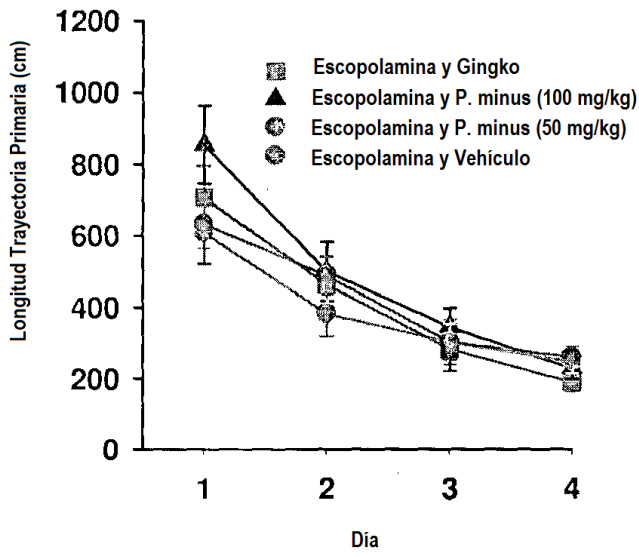


Fig. 8a

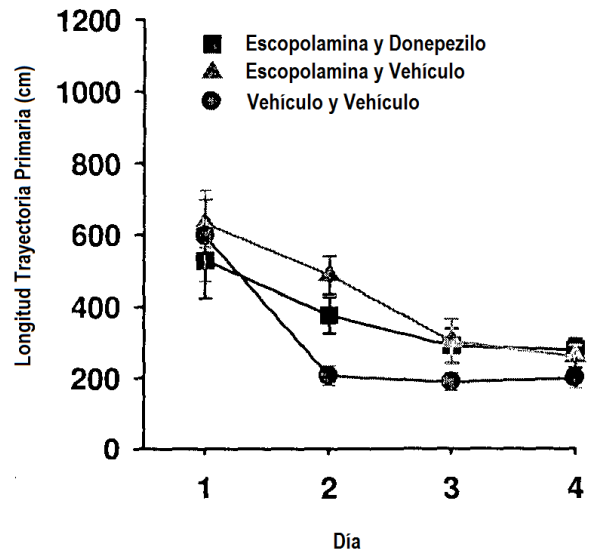


Fig. 8b

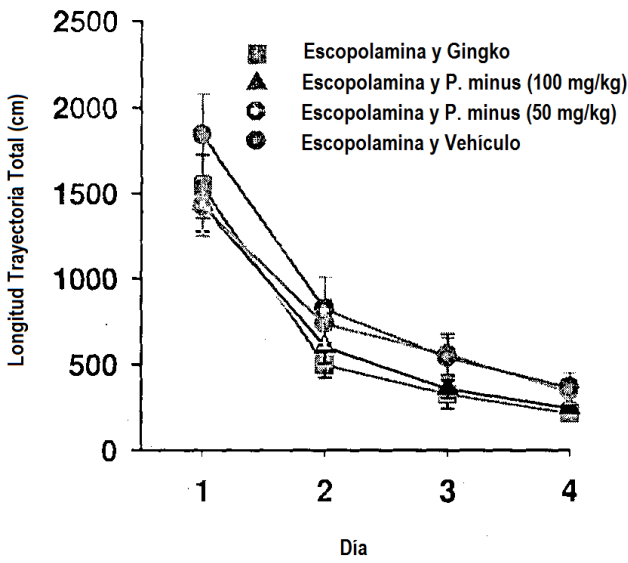


Fig. 8c

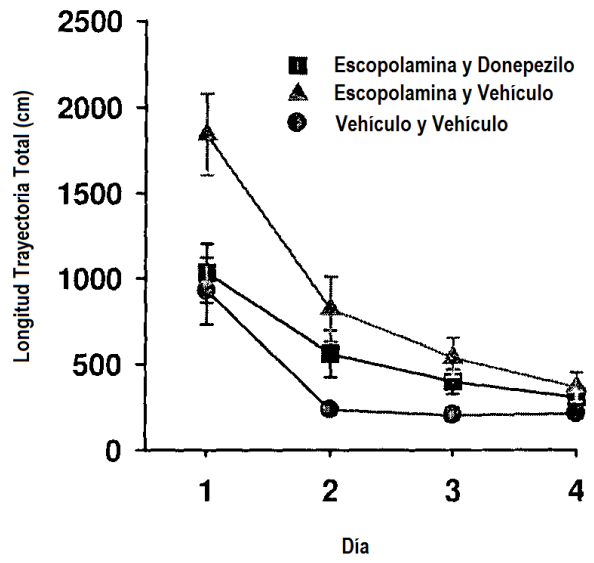


Fig. 8d

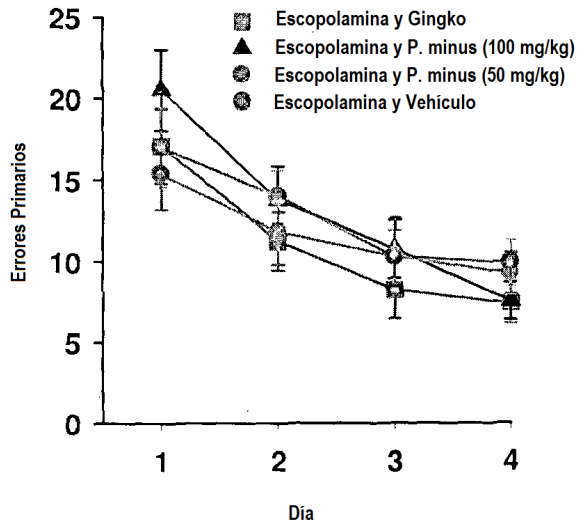


Fig. 9a

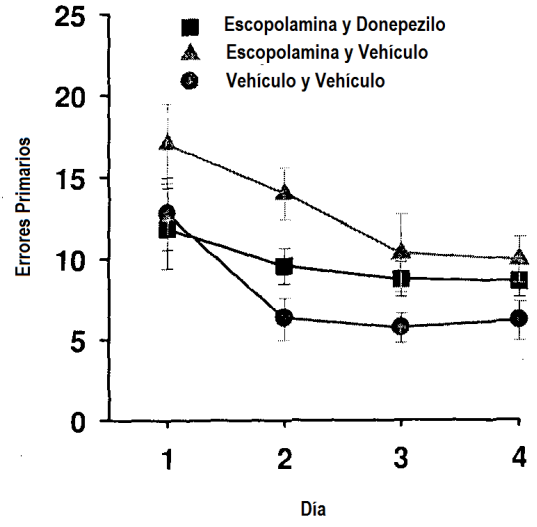


Fig. 9b

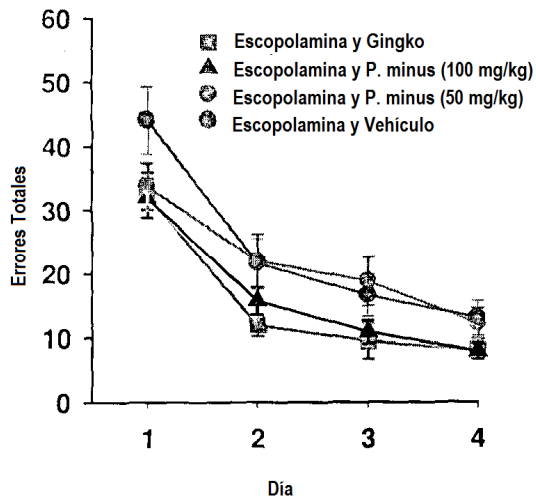


Fig. 9c

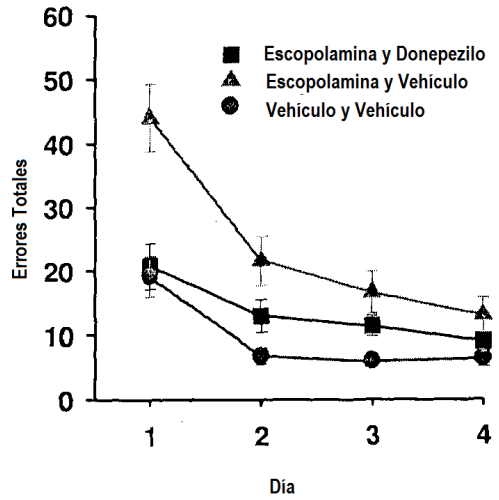


Fig. 9d

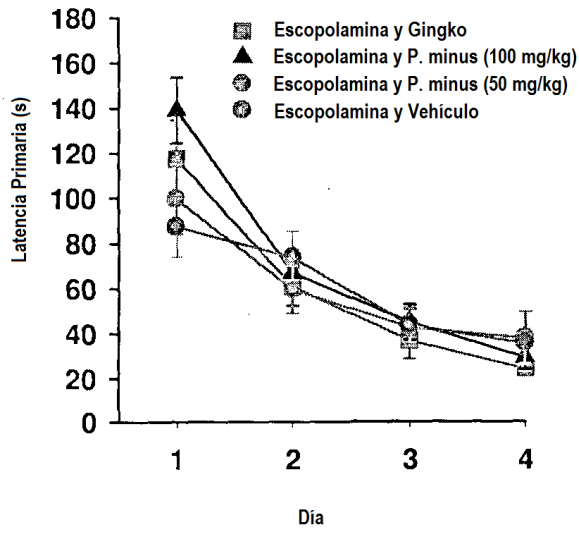


Fig. 10a

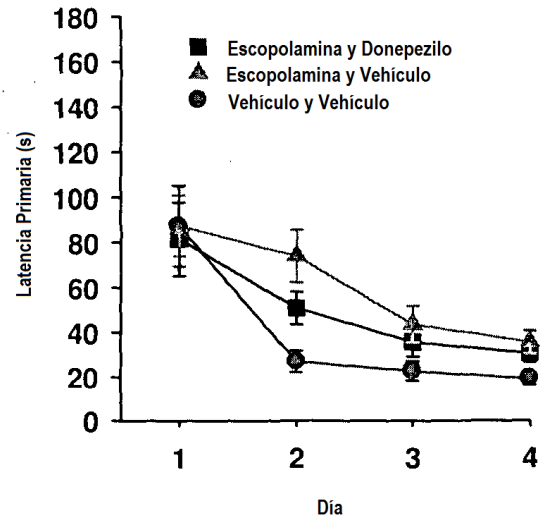


Fig. 10b

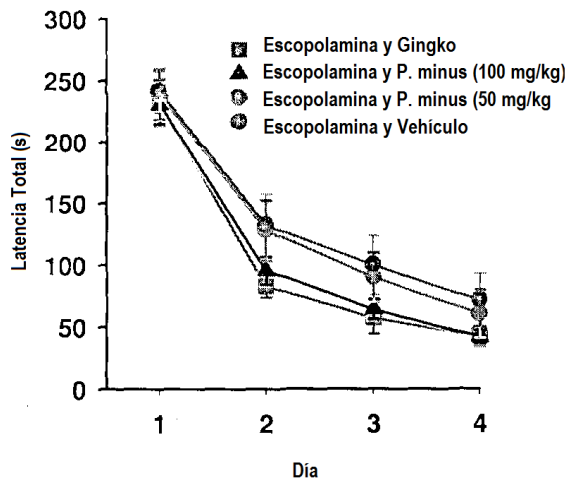


Fig. 10c

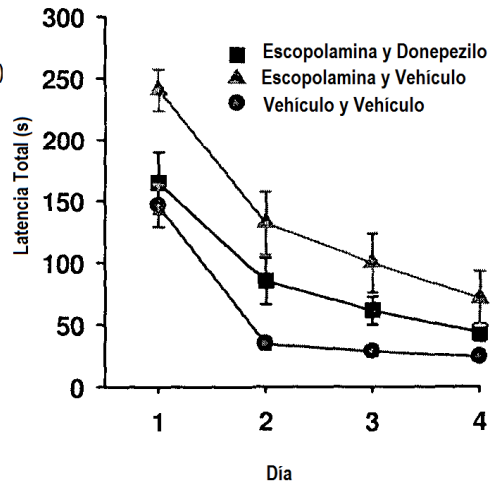


Fig. 10d

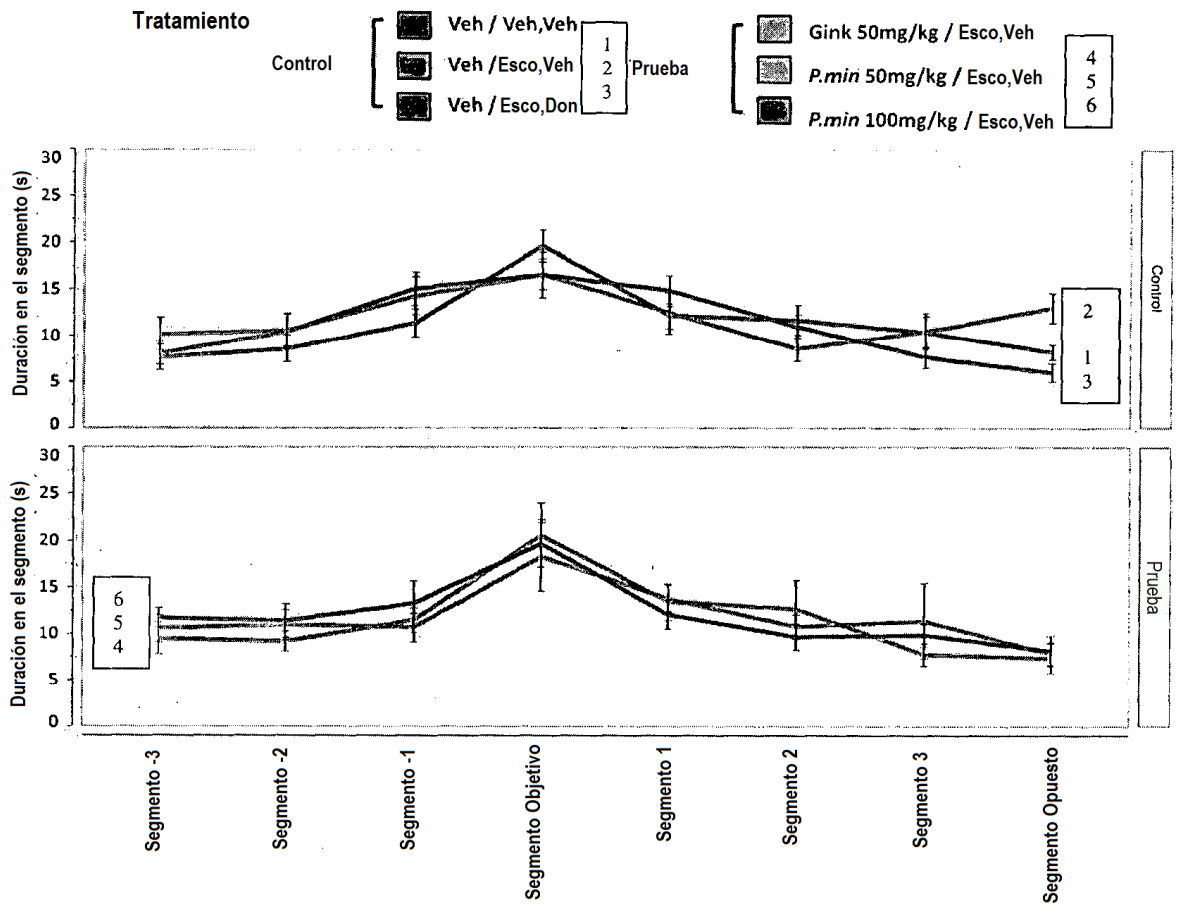


Fig. 11