



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

“ANÁLISIS ISOBOLOGRÁFICO DE LA INTERACCIÓN  
ENTRE FÁRMACOS DEPRESORES DEL SISTEMA  
NERVIOSO CENTRAL Y EL FLAVONOIDE  
HESPERIDINA.”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

**P R E S E N T A :**

**MONICA ARACELY VILLAGÓMEZ VELA**



MEXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado:

**Presidente:** Prof. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

**Vocal:** Prof. ANA MARÍA VÁZQUEZ ÁLVAREZ

**Secretario:** Prof. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO

**1er. Suplente:** Prof. ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ

**2°. Suplente:** Prof. MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Laboratorio 126 del conjunto E, Departamento de Farmacia,  
Facultad de Química, UNAM.

**Asesor del tema:** Dr. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO \_\_\_\_\_

**Sustentante:** MONICA ARACELY VILLAGÓMEZ VELA \_\_\_\_\_

## **Agradecimientos.**

*Este proyecto fue financiado parcialmente por la Dirección  
General de Asuntos del Personal Académico, UNAM  
(Proyecto DGAPA, IN 201506)*

## **Agradecimientos.**

**Al Dr. Andrés Navarrete.**

*Por sus conocimientos, experiencia y dedicación aportados para la realización de este trabajo, por su calidez humana, porque nunca dejo de creer en mí, y por procurar mantener siempre un ambiente agradable dentro del laboratorio.*

**A la M. en C. S. Laura Guzmán.**

*Por tu apoyo, por las largas horas de experimento en las que nació una bonita amistad y por enseñarme el valor del trabajo en equipo.*

**A mis Compañeros de Laboratorio**

*Con los cuales he compartido incontables horas de trabajo por su apoyo, comprensión.*

## *Dedicatoria.*

### **A mi madre:**

*Por el apoyo y la comprensión que me brindaste durante los años de mi carrera y en la realización de mi tesis, por estar presente cuando te necesite y por todo tu amor.*

### **A mi padre:**

*Por todo tu cariño, respeto, cooperación, y por la confianza que siempre me has tenido para la realización de mis proyectos.*

### **A mi tía Rosa Ma.:**

*Por todo tu apoyo, por tus consejos y tu ayuda incondicional personal y profesionalmente a lo largo de toda mi vida, por ser mi guía y sobre todo por tu amistad.*

### **A mi hermana Rosa Martha:**

*Por ser mi amiga, por tu apoyo y ayuda durante mi vida.*

### **A mis amigos:**

*Por que gracias a ustedes el camino se hizo más ligero, por compartir tantos momentos de alegría y a veces de tristeza, dentro y fuera de la universidad, por el apoyo recibido, por su amor y por la gran amistad que hemos formado.*

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>5</b>
2.1. Insomnio.....	5
2.2. Tratamiento del insomnio.....	6
2.2.1. Tratamiento farmacológico.....	6
2.2.1.1. Características de los fármacos depresores del sistema nervioso central utilizados en este trabajo.....	7
2.2.2. El uso de plantas medicinales.....	14
2.3. Flavonoides.....	17
2.3.1. Aspectos generales.....	17
2.3.2. Flavonoides con acción sobre el sistema nervioso central.....	20
2.4. Flavonoide hesperidina.....	21
2.4.1. Aspectos dentro del sistema nervioso central.....	21
2.4.2. Aspectos químicos y farmacológicos.....	22
2.5. Análisis isobolográfico.....	25
2.5.1. Aplicaciones y ventajas del análisis.....	25
2.5.2. Fundamento y bases estadísticas para el análisis.....	26

<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>31</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>32</b>
<b>V. OBJETIVO.....</b>	<b>33</b>
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODO.....</b>	<b>34</b>
6.1. Fármacos y sustancias.....	34
6.2. Dosificación.....	34
6.3. Animales.....	34
6.4. Procedimiento de la evaluación del efecto sedante.....	35
6.4.1. Modelo de Cilindro de Exploración.....	35
6.5. Determinación de las curvas dosis-respuesta.....	35
6.6. Análisis de la interacción.....	36
6.7. Análisis estadístico.....	40
6.8. Representación gráfica de la interacción.....	41
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>50</b>
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>53</b>
<b>X. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>54</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>55</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Estructura química de la buspirona.....	8
<b>Figura 2.</b> Estructura química del diacepam.....	9
<b>Figura 3.</b> Estructura química de la difenhidramina.....	10
<b>Figura 4.</b> Estructura química del etanol.....	11
<b>Figura 5.</b> Estructura química del haloperidol.....	12
<b>Figura 6.</b> Estructura química del pentobarbital.....	13
<b>Figura 7.</b> Biosíntesis de los flavonoides.....	18
<b>Figura 8.</b> Estructuras químicas de flavonoides.....	19
<b>Figura 9.</b> Estructura química de la hesperidina (hesperetin-7-ramnoglucósido).....	23
<b>Figura 10.</b> Isoblograma.....	28
<b>Figura 11.</b> Curvas dosis-respuesta de las combinaciones de fármaco:hesperidina en las tres proporciones evaluadas.....	42
<b>Figura 12.</b> Isoblograma de la interacción entre buspirona y el flavonoide hesperidina.....	44
<b>Figura 13.</b> Isoblograma de la interacción entre diacepam y el flavonoide hesperidina.....	45
<b>Figura 14.</b> Isoblograma de la interacción entre etanol y el flavonoide hesperidina.....	46

**Figura 15.** Isoblograma de la interacción entre haloperidol y el flavonoide hesperidina.....47

**Figura 16.** Isoblograma de la interacción entre difenhidramina y el flavonoide hesperidina.....48

**Figura 17.** Isoblograma de la interacción entre pentobarbital y el flavonoide hesperidina.....49

### ÍNDICE DE CUADROS.

**Cuadro 1.** Actividades reportadas para el flavonoide hesperidina.....24 y 25

**Cuadro 2.** Valores de  $DE_{50} \pm$  error estándar de la media, de la hesperidina y algunos fármacos depresores del sistema nervioso central en ratones ICR.....36

**Cuadro 3.** Dosis utilizadas en el estudio de la interacción sedante entre la hesperidina y algunos fármacos depresores del SNC en ratones machos ICR.....37-39

**Cuadro 4.** Valores de  $Z_{ad}$  y  $Z_{exp} \pm$  EEM para la administración conjunta de hesperidina y los diferentes fármacos depresores del sistema nervioso central en diferentes proporciones.....42

## **RESUMEN.**

La hesperidina es un flavonoide al cual se le atribuyen un amplio rango de actividades, pero se conoce muy poco sobre su acción a nivel del sistema nervioso central, menos aún se conoce si puede existir algún tipo de interacción con otros fármacos.

En este trabajo se presenta el análisis isobolográfico realizado para evaluar la interacción del efecto sedante reportado para el flavonoide hesperidina cuando se co-administra con alguno de seis fármacos depresores del sistema nervioso central, en ratones ICR utilizando el modelo de cilindro de exploración.

Para el análisis sólo se consideraron las dosis equiefectivas ( $DE_{50}$ ) de cada fármaco individual obtenidas de las curvas dosis-respuesta respectivas y se evaluó el efecto de la co-administración de la hesperidina y cada uno de los fármacos depresores del SNC a las proporciones fijas 3:1, 1:1 y 1:3.

La relación encontrada entre el flavonoide hesperidina y los fármacos: buspirona, diacepam, difenhidramina, etanol y haloperidol fue de tipo aditiva. En el caso de pentobarbital en la proporción 1:3, se presentó una interacción sub-aditiva o antagonista, en tanto que para las proporciones 3:1 y 1:1 se encontró una relación aditiva.

Con los efectos aditivos encontrados, y sabiendo que hasta el momento no existen reportes de toxicidad del flavonoide hesperidina, se sugiere que podría utilizarse en la farmacoterapia combinando la hesperidina en cierta proporción con fármacos utilizados para tratar el insomnio, con el propósito de disminuir los efectos indeseables causados por el fármaco solo.

**ABSTRACT.**

Hesperidine is a flavonoid to whom a wide range of activities had been attributed, but there is few information about its actions in the central nervous system, and there is less knowledge about interactions that could exist with other CNS-depressant drugs.

This study shows the isobolographic analysis made to evaluate the interaction of the sedative effect reported for the flavonoid hesperidine when is co-administered with each one of six depressant drugs of the central nervous system, using ICR mice in the model of exploration cylinder.

For the analysis were only considered the equi-effective doses ( $DE_{50}$ ) of each individual drug obtained from the respective dose-response curves and were evaluate in three fixed proportions 3:1, 1:1 and 1:3 of hesperidine- CNS depressant drug.

The relation found between the flavonoid hesperidine and drugs: buspirona, diacepam, difenhidramina, ethanol and haloperidol, were additive. In the case of pentobarbital in the proportion 1:3 an interaction sub-additive was found and a relationship additive in the proportions 3:1 and 1:1.

Summarizing the additive effects found in this study, with the knowledge that do not exist any reports of toxicity of the flavonoid hesperidine, we could suggested in the pharmacotherapy the combination of hesperidine in certain proportion with drugs that are used to treat the insomnia, with the purpose to diminished undesirable effects caused by the drug alone.

## I. INTRODUCCIÓN.

El uso de plantas medicinales durante mucho tiempo fue el único recurso utilizado por las primeras civilizaciones. En México la raíz de esta tradición viene desde las culturas mesoamericanas y hoy en día aún persiste el uso de remedios naturales. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 65-80% de la población mundial que vive en países en desarrollo, emplea las plantas esencialmente para aliviar sus enfermedades. Actualmente la población también utiliza fármacos cuyos componentes activos en su mayoría son aislados de plantas.

El insomnio es un problema muy común entre la población, es considerado el desorden más común del sueño y generalmente afecta más a las personas de edad avanzada. Los fármacos más utilizados para el tratamiento del insomnio son las benzodiazepinas, las cuales producen efectos secundarios no deseados como tolerancia, dependencia, amnesia y miorelajación. En la búsqueda de nuevas alternativas se ha optado por el uso de diversas plantas como la valeriana, a la cual se le ha demostrado actividad sedante.

La valeriana tiene como componentes principales a los valepotriatos, baldrinales (productos de descomposición de los valepotriatos) y al ácido valérico sin embargo existen otros componentes presentes que pudieran ser los responsables, por sí solos o de manera sinergista entre ellos, de la actividad sedante reportada. Uno de los componentes que recientemente se reportó como aislado del género *Valeriana* es la hesperidina, que es un glicósido de flavanona.

La hesperidina fue descubierta por primera vez, aunque no en un estado puro, en 1827 por Lebreton, desde entonces ha estado en continua investigación, lo cual ha llevado a atribuirle diversas actividades. Se encuentra presente en grandes cantidades en los cítricos tales como la naranja dulce y el limón (familia Rutacea), por lo que es muy común encontrar a la hesperidina asociada a la vitamina C. Su presencia también se ha demostrado en otras familias no cítricas como en la Fabaceae, Betulaceae, Lamniaceae, Araliaceae, Papilionaceae y Valerianaceae.

Los estudios de interacción fármaco-planta medicinal son un tema importante a considerar; sin embargo este tipo de estudios son escasos. Existe una carencia de estudios bien documentados en esta área y hay pocos estudios que hayan evaluado específicamente las interacciones planta-fármaco. Menos aún se conocen los estudios de interacción entre un componente activo de la planta medicinal con otros fármacos.

Por las razones antes mencionadas, en este estudio se pretende analizar si existe alguna interacción entre el flavonoide hesperidina, presente al menos en dos especies de Valeriana: *V. officinalis* y *V. wallichii*, y seis fármacos depresores del sistema nervioso central. El estudio se realizará con ayuda del análisis isobolográfico, el cual es un análisis riguroso que ha demostrado ser muy útil y conveniente para analizar la interacción entre dos sustancias con actividad similar.

Los resultados que se obtengan pueden servir para pensar en una alternativa al tratamiento del insomnio, aunque también para conocer si pudiera existir algún tipo de interacción favorable o desfavorable, al utilizar conjuntamente fármacos depresores del sistema nervioso central con productos naturales que contengan hesperidina.

## 2.1. Insomnio.

El sueño esta compuesto por diferentes etapas. El sueño REM nombrado así por sus siglas en inglés Rapid Eyes Movement, y el sueño no REM que a su vez se divide en cuatro fases (fase I a IV). Cuando soñamos pasamos por las diferentes etapas hasta llegar a la fase V o REM; esto transcurre en 4 o 5 ciclos con duración de 90 a 120 minutos (López, 2006).

El insomnio es la disfunción del sueño más frecuente, y es el problema psicológico más frecuente; se estima que entre el 10%-15% de las personas adultas sufre de algún tipo de insomnio, y que 50% de los adultos mayores experimentan insomnio crónico (Benca, 2005).

El insomnio puede ser de corta o larga duración. (López, 2006). Dentro del de corta duración tenemos el insomnio transitorio, que dura menos de tres días y suele originarse de un agente ambiental o situacional que genera tensión; y el insomnio breve que dura de tres días a tres semanas y suele deberse a un factor personal de tensión sostenido, como enfermedad, pesar o problemas en el trabajo. Por su parte el insomnio de larga duración o prolongado es aquel que ha durado más de tres semanas y quizá no se pueda identificar un factor específico de tensión (Charney et al., 2006).

Generalmente el insomnio es causado por desórdenes en el dormir (Harvey, 2001). Existen factores que alteran el sueño y éstos los podemos clasificar en diferentes tipos: físicos, fisiológicos, psicológicos, psiquiátricos e iatrogénicos.

Físicos: enfermedades que causen dolor, tos, prurito, disnea (dificultad para respirar), enuresis (no contención de la orina/micción involuntaria).

Fisiológicas: cuando existen disturbios o alteraciones externos que provocan insomnio como los que experimentan los trabajadores por turnos, sobrecargos y tripulación de aviones. Dormir bajo condiciones inadecuadas de luz y sonido, o cuando se duerme con un compañero que ronca: así como beber café o té, o alcohol en grandes cantidades.

Psicológicos: preocupaciones que experimenta la persona y que le impiden tener un sueño normal.

Psiquiátrico: enfermedades de la mente como ansiedad, depresión, pánico, fobias y desórdenes compulsivos, y psicosis.

Iatrogénico: se refiere a los disturbios causados por el uso de otros fármacos, como son los broncodilatadores, agentes adrenérgicos,  $\beta$ -bloqueadores, diuréticos que son tomados por la noche y que causan poliuria. (Weatley, 2005).

Es importante entender y distinguir entre los términos de efecto sedante, hipnótico (Weatley, 2005) y ansiolítico.

Sedante: es cuando hay una disminución en las funciones cognitivas; modera la excitación y tranquiliza en general a la persona que lo recibe.

Hipnótico: se caracteriza por inducir por si mismo el sueño y facilita el inicio y la conservación de un estado de sueño similar al sueño natural en sus características electroencefalográficas, y a partir del cual se puede despertar con facilidad al paciente.

Ansiolíticos: es aquel que alivia o suprime el síntoma de ansiedad, sin producir sedación o sueño (Hurlé, 1999).

## **2.2. Tratamiento del insomnio.**

Para tratar el insomnio se cuenta con diversos agentes farmacológicos pero existe la controversia entre usar el tratamiento farmacológico o no farmacológico, y uso de hipnóticos de acción breve o prolongada (Charney et al., 2006).

### **2.2.1. Tratamiento farmacológico.**

Los fármacos más comúnmente utilizados para tratar el insomnio son las benzodiazepinas, las ciclopirrolonas, las imidacopiridinas y los antihistamínicos  $H_1$ , pero la mayoría de ellos presentan la desventaja de tener diversos efectos adversos. (Weatley, 2005). Así por ejemplo, las benzodiazepinas tienen entre sus efectos adversos la disminución de la función y coordinación motora, lo que incrementa la posibilidad de sufrir accidentes automovilísticos o fracturas, resaca diurna, dependencia, adicción, ataxia, amnesia e intolerancia al alcohol. Por su parte las ciclopirrolonas,



específicamente la zopiclona, provocan dependencia y efecto de resaca (diurno) ocasionalmente. (Carlini, 2003; Weatley, 2005).

Los sedantes-hipnóticos que no son benzodiazepinas pertenecen a un grupo de agentes que deprimen al sistema nervioso central de una manera dependiente de la dosis, con tranquilidad progresiva y somnolencia (sedación), sueño (hipnosis farmacológica), pérdida del conocimiento, coma, anestesia quirúrgica, y depresión letal de la respiración y de la regulación cardiovascular. Entre ellos podemos encontrar a los alcoholes alifáticos, particularmente al etanol (Charney et al., 2006).

#### **2.2.1.1. Características de los fármacos depresores del sistema nervioso central utilizados en este trabajo.**

##### Buspirona:

Su nombre químico según la IUPAC es: 8-[4-(4-pirimidin-2-ilpiperazin-1-il)butil]-8-azaspiro[4.5]decano-7,9-diona y pertenece al grupo de las azaspirodecanodionas. (Hurlé, 1999).

Es un fármaco utilizado en el tratamiento de los trastornos de ansiedad, que no está relacionado químicamente ni farmacológicamente con las benzodiazepinas, los barbitúricos ni otros fármacos sedantes/ansiolíticos (Eison y Temple, 1986). Su principal inconveniente es la lentitud con que comienza su actividad terapéutica, tardando hasta dos semanas en instaurarse la acción ansiolítica (Hurlé, 1999).

Inhibe la actividad serotoninérgica debido a que se une con gran afinidad a los receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Sanders y Mayer, 2006, Gobert et al., 1999).

Al mismo tiempo bloquea los receptores presinápticos dopaminérgicos debido a que presenta afinidad moderada por los receptores D<sub>2</sub> dopaminérgicos en el cerebro (Sanders y Mayer, 2006, Gobert et al., 1999).

La buspirona se absorbe con rapidez en el aparato digestivo (30-60min), con un importante primer paso metabólico, formando metabolitos, entre ellos el 1-(2-pirrimidil)-piperazina (1-PP), el cual es un antagonista de los receptores  $\alpha_2$ -

adrenérgicos e ingresa al sistema nervioso central, donde alcanza altas concentraciones (Gobert et al., 1999).

La buspirona con respecto a las benzodiazepinas produce menor incidencia en los efectos no deseados, por ejemplo en el deterioro psicomotor, pero puede producir cierta sensación de mareo, vértigo, cefalea, sudor, inquietud, nerviosismo y náuseas (Hurlé, 1999).

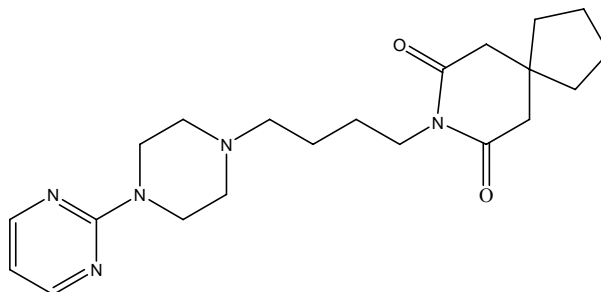


Figura 1. Estructura química de la buspirona.

#### Diaepam:

Su nombre químico según la IUPAC es: 9-cloro-2-metil-6-fenil-2,5-diazobicyclo[5.4.0]undeca-5,8,10,12-tetraen-3-ona y pertenece al grupo de las benzodiazepinas.

Es una benzodiazepina, con efecto: sedante, hipnótico, disminución de la ansiedad, relajación muscular, amnesia anterógrada y actividad anticonvulsiva (Charney et al., 2006).

El diaepam actúa potenciando la inhibición GABAérgica por medio del receptor  $GABA_A$  el cual está ligado a canal iónico, que responde a cloruro, y está compuesto por cinco subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  (McKernan et al., 2000).

El receptor  $GABA_A$  tiene dos estados conformacionales, que generalmente se encuentran en equilibrio, uno de ellos se presenta cuando se une GABA provocando que se abra el canal de cloro, y el otro se presenta cuando no se abre el canal (Pleuvry 2004).

La interacción del diacepam con sus sitios de fijación específicos favorece la conformación que responde a GABA, es decir aumenta la conductancia de  $\text{Cl}^-$  en presencia de GABA, dado que incrementa la frecuencia de aberturas del canal  $\text{Cl}^-$ , provocando así una hiperpolarización y como consecuencia inhibiendo la actividad celular. (Sellers et al., 2002; Pleuvry 2004).

El diacepam tiene dos metabolitos activos, por desmetilación forma el desmetildiacepam y después por 3-hidroxilación forma el oxacepam (Sellers et al., 2002).

Se ha demostrado que la subunidad  $\alpha_1$  del receptor  $\text{GABA}_A$  es la principal responsable de los efectos de benzodiazepinas como el diacepam, mientras que son otro tipo de subunidades las que están involucradas en la actividad ansiolítica (McKernan et al., 2000).

Los efectos no deseados del diacepam están asociados a disfunción e incoordinación motora (Benca, 2005), así como a ataxia, trastornos de las funciones mentales, confusión, letargia, visión borrosa, náusea, vómito, debilidad y dependencia (Barrera, 2003). La frecuencia de estos efectos aumenta con la edad, dosis, duración del tratamiento y coexistencia de enfermedad del hígado e hipoalbumemia (Sellers et al., 2002).

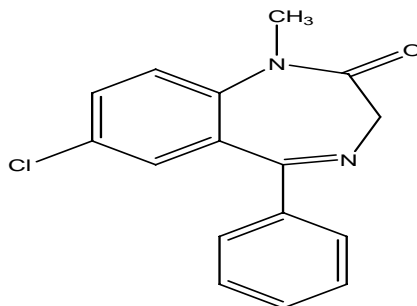


Fig 2. Estructura química del diacepam.

### Difenhidramina:

Su nombre químico según la IUPAC es 2-benzidriloxi-N,N-dimetil-etanamina, y pertenece al grupo de los antihistamínicos de la clase de las etanolaminas y es de los llamados antihistamínicos de primera generación (Kadar, 2002).

Es un bloqueador competitivo del receptor H<sub>1</sub>, debido a que presenta gran similitud estructural con la histamina (Kadar, 2002). Presenta también efectos anticolinérgicos (deseccante), antitusivos, antieméticos y sedantes significativos.

Aunque los antihistamínicos de primera y segunda generación comparten acciones antihistamínicas, la diferencia radica en que los de la segunda generación presentan mayor selectividad por el receptor H<sub>1</sub>, escasa o nula capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, no existen efectos anticolinérgicos, y no presentan efectos depresores centrales, como sedación o somnolencia (Pazos, 1999).

Todos los antihistamínicos se absorben bien vía oral, pero la biodisponibilidad suele ser inferior al 50% porque están sometidos a un elevado fenómeno de primer paso (Pazos, 1999), siendo el principal sitio de biotransformación de la difenhidramina y de los antihistamínicos es el hígado (Kadar, 2002).

Los antihistamínicos empleados como sedantes son muy frecuentes debido quizá a su bajo costo y fácil alcance entre la población; particularmente la difenhidramina es la más ampliamente utilizada, pero ningún estudio ha demostrado su eficacia en el mantenimiento del sueño después de más tres semanas de consumirla, parece producir tolerancia a sus efectos inductores del sueño después de algunas semanas (Benca, 2005).

Presenta efectos no deseados como disfunción psicomotora y cognitiva, retención urinaria, visión borrosa, dilatación de las pupilas, mareo, cansancio y debilidad (Benca, 2005; Pazos, 1999).

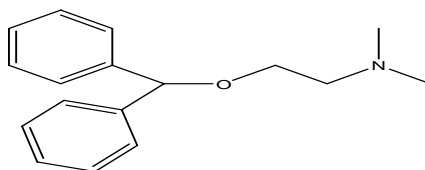


Figura 3. Estructura química de la difenhidramina.

Etanol:

El etanol es una molécula pequeña y poco polar que atraviesa bien las membranas biológicas. Se absorbe por difusión simple en el estómago y sobre todo en el intestino, distribuyéndose en el agua total del organismo y atravesando con facilidad las barreras hematoencefálica y placentaria. Más del 90% del etanol sufre metabolización hepática. En una primera oxidación pasa a acetaldehído que, a su vez, es oxidado a ácido acético, que forma acetyl Co-A y se metaboliza en CO<sub>2</sub> y agua (Camí y Ayesta, 1999).

En concentraciones relativamente bajas, el etanol afecta el hipocampo, el hipotálamo, y la formación reticular ascendente, que forman un mecanismo importante para despertar (Kalant y Khanna., 2002).

Subjetivamente, las dosis bajas suelen provocar relajación y sedación suave en un individuo en reposo. Cuando se infunde alcohol con lentitud por vía intravenosa, el aumento progresivo de la dosis total provoca mayor sedación, sueño y finalmente anestesia y coma. En circunstancias sociales en las que se bebe alcohol, al principio la sedación se acompaña de pérdida del control inhibitorio de las emociones y esto se puede observar también en electroencefalogramas donde a dosis bajas el electroencefalograma es desincronizado (despierto) con incremento en la frecuencia; por el contrario a dosis altas, con aumento en la somnolencia, hay un desplazamiento progresivo hacia la sincronización del electroencefalograma con amplitud incrementada y descenso regular en frecuencia. (Kalant y Khanna., 2002).

El etanol tiene una acción farmacológica similar a los barbituratos y benzodiazepinas en cuanto a que potencia el efecto inhibitorio del ácido gamma aminobutírico (GABA) por medio de un incremento en la conductancia del canal de cloro acoplado al receptor GABA<sub>A</sub> (Liu y Deitrich, 1998).



Figura 4. Estructura química del etanol.

### Haloperidol:

Su nombre químico según la IUPAC es: 4-[4-(4-clorofenil)-4-hidroxi-1-piperidil]-1-(4-fluorofenil)-butan-1-ona y pertenece a la familia de las butirofenonas. En 1958 Janssen descubrió las propiedades antipsicóticas del haloperidol y a partir de entonces siguieron explorándose los usos antipsicóticos de otras sustancias similares (Baldessarini y Tarazi, 2006).

El mecanismo exacto por medio del cual el haloperidol produce sus efectos no se conoce. Se piensa que su efecto sobre el sistema nervioso central, está asociado al bloqueo competitivo de los receptores postsinápticos del tipo  $D_2$  de dopamina, en el sistema mesolímbico-dopaminérgico y a un incremento en la producción de dopamina por parte del cerebro. Aunque también se conoce que tiene fuerte actividad antiadrenérgica y débil actividad periférica anticolinérgica; además de poseer también una leve actividad antihistamínica y antiserotonérgica (Flórez, 1999).

Algunos de los efectos no deseados del haloperidol son: sedación, y reacciones extrapiramidales, (parkinsonismo) que se manifiesta con temblor, salivación y rigidez (Flórez, 1999).

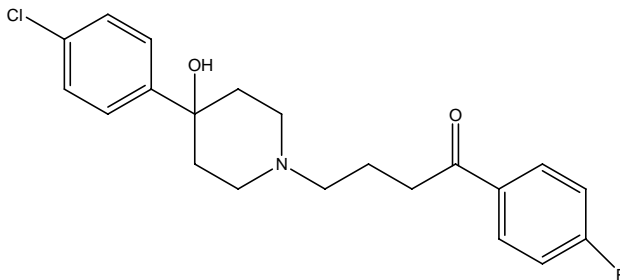


Figura 5. Estructura química del haloperidol.

Pentobarbital:

Su nombre químico según la IUPAC es: 5-etil-5-pentan-2-il-1,3-diazinano-2,4,6-triona y pertenece al grupo de los barbitúricos.

Es ampliamente utilizado como sedante e hipnótico para el tratamiento a corto plazo del insomnio y como premedicación quirúrgica. El uso de barbitúricos ha sido sustituido por las benzodiazepinas (Hurlé, 1999).

Los barbitúricos aumentan la transmisión de GABA, y en bajas dosis tienen propiedades farmacológicas similares a las benzodiazepinas, esto lo hacen alterando los mecanismos que bloquean el canal de cloro por lo que permanece abierto el canal por más tiempo en respuesta a GABA. Esta acción ocurre en diversos receptores de GABA<sub>A</sub>, incluyendo aquellos insensibles a benzodiazepinas. Adicionalmente, a altas dosis de barbitúricos, el canal de cloro se puede abrir por períodos mayores tales que la neurona es incapaz de realizar la despolarización y se inactiva. Estos aspectos son los que hacen que los barbitúricos sean más tóxicos que las benzodiazepinas (Ito et al., 1996; Pleuvry 2004).

Los efectos no deseados de los barbitúricos a dosis bajas, ocasionalmente, producen hiperactividad de la corteza, lo cual semeja a la intoxicación alcohólica temprana; con dosis grandes, la depresión puede persistir por un tiempo mayor del propuesto, además de que el sujeto al día siguiente se siente vacilante y drogado, todo esto es debido a la vida media relativamente prolongada. El uso crónico puede causar tolerancia, dependencia. Con una sobredosis se presentan: respiración, frecuencia cardíaca y presión arterial reducidas, que puede terminar en muerte (Sellers et al., 2002).

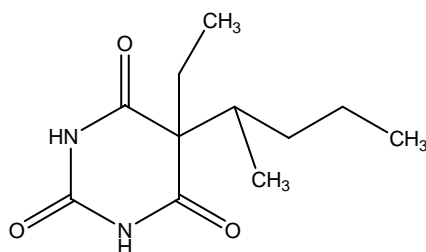


Figura 6. Estructura química del pentobarbital.

### 2.2.2. El uso de plantas medicinales.

Se tiene la creencia errónea de que las plantas por provenir de la naturaleza debieran ser menos tóxicas que las drogas sintéticas, pero no en todos los casos es así.

Entre un 20 a 28% de la población de los Estados Unidos usan tratamientos alternativos para enfermedades del sistema nervioso central tales como insomnio, dolor de cabeza, ansiedad y depresión; y de éste porcentaje el 3% utiliza plantas medicinales (Carlini, 2003).

Se calcula que una cuarta parte de la población, en algún momento presenta problemas con el sueño. Además del tratamiento con fármacos, existe el tratamiento fitoterapéutico y entre las plantas más utilizadas están el kava kava, la pasiflora, la amapola de California, el espino albar, el lúpulo y la valeriana (López, 2006).

Kava-kava. *Piper methysticum*.

El extracto de las raíces de la planta polinesia *Piper methysticum* es llamado Kava-kava, y es usado por sus efectos sedantes, afrodisíacos y estimulantes (Weatley, 2005).

Existen varios estudios doble ciego que muestran que las kavalactonas tienen un claro efecto ansiolítico, además de mejorar la calidad del sueño y no deprimir las funciones mentales y motoras (Carlini, 2003). Kava-kava contiene numerosos compuestos pero no se conoce cuál o cuáles son los responsables de la actividad (Weatley, 2005).

Entre los efectos adversos que se han encontrado en humanos, están la pérdida de cabello, dificultades para respirar, ataxia, piel amarilla, anorexia, pérdida de peso y recientemente se reportó hepatotoxicidad (Carlini, 2003; Weatley, 2005).

Pasiflora. *Pasiflora incarnata* L.

Los extractos de pasiflora son obtenidos de hojas, tallos y en ocasiones flores. Aunque se ha demostrado efecto sedante para los extractos de pasiflora, se desconoce a qué principios activos se debe la actividad. Su composición química incluye flavonoides,



derivados piránicos, heterósidos cianogenéticos, ácidos fenólicos, cumarinas, entre otros (López, 2006).

Amapola de california. *Eschscholtzia californica* Cham.

Se utiliza la parte aérea de la planta y se ha visto que el extracto induce el sueño, potencia la acción de los barbitúricos y disminuye la acción motora.

Tradicionalmente se usa para el tratamiento del insomnio, nerviosismo, ansiedad y depresión y a las dosis terapéuticas recomendadas no se han observado reacciones adversas (López, 2006).

Espino albar. *Crataegus monogyna* Jacq.

Se utilizan las sumidades floridas. Según la Comisión E del Ministerio de Sanidad alemán, está indicada en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca y bradicardia, pero también es muy útil en caso de insomnio y nerviosismo asociado a taquicardias y palpitaciones, produce una depresión del sistema nervioso central con lo que disminuye el período de inducción al sueño.

Está contraindicado durante el embarazo, y su administración simultanea con digoxina puede causar toxicidad; en dosis altas puede provocar náuseas, vómitos, dolor abdominal o diarrea (López, 2006).

Lúpulo. *Humulus lupulus* L.

La parte que se utiliza son las inflorescencias femeninas con forma de cono, llamados estróbilos. Tiene acción hipnótica y orexígena (estimulante del apetito). Según la Comisión E del Ministerio de Sanidad alemán, ésta planta está indicada en el tratamiento del insomnio, nerviosismo y ansiedad (López, 2006).

*Valeriana officinalis* L.

Varias especies de Valeriana son fuentes de medicamentos naturales desde 800 años A.C, y ahora está siendo utilizada como sedante, con tal éxito que ha sido nombrada “el Valium des siglo XIX” (Marder et al., 2003).

La parte activa de esta planta la constituyen las partes subterráneas (raíces, rizomas y estolones). Dentro del extracto de valeriana varios son los compuestos responsables de la actividad, los valepotriatos, llamados así por ser ésteres de terpenoides y que son de los principios activos más importantes encontrados en esta planta pero también existen los baldriales que son productos de la descomposición de los valepotriatos; los isovalepotriatos; los lignanos; los ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico; los terpenoides no volátiles, como el ácido valérico presente en el aceite esencial; sesquiterpenos y taninos, entre otros (Fernández et al., 2004; López, 2006; Marder et al., 2003.). Se ha encontrado que tanto los valepotriatos como sus productos de descomposición tienen efectos mutagénicos, por lo que son más recomendadas, las preparaciones de valeriana que no contengan los valepotriatos (Fernández et al., 2004; Marder et al., 2003).

Su mecanismo de acción es en gran parte desconocido, y se conocen ciertos factores que ponen en duda si solamente el ácido valérico, los valepotriatos y los baldriales son responsables de los efectos de la valeriana, o si existen otros componentes en las preparaciones que se utilizan de valeriana (Fernández et al., 2004).

Se asume que el ácido valérico es el componente más importante en la valeriana, pero hoy en día esta idea no es soportada, ya que el ácido valérico está solo presente en *V. officinalis* y *V. sitchensis* pero no en otras especies activas como *V. wallichii*, *V. edulis* y *V. procera* (Navarrete et al., 2006). Aunado a esto se ha demostrado que el ácido valérico no tiene efecto sedante en ratones a dosis bajas (15 mg/kg) (Fernández et al., 2004).

Aunque la valeriana tiene efecto sedante, algunos autores consideran que no es el agente adecuado para el tratamiento agudo del insomnio, proponen que el valor de la valeriana recae quizá en su habilidad por promover el sueño natural después de varias semanas de uso sin riesgo de dependencia o de tener efectos adversos. Estudios realizados por Vorbach et al. (1996), sugieren que las preparaciones de valeriana probablemente no producen sus efectos inmediatamente, sino que se necesitan de 2 a 4 semanas de terapia para alcanzar mejorías notables (Weathley, 2005).

En cuanto a los efectos adversos solo un estudio realizado ha reportado efectos adversos en algunas personas, como son dolor de cabeza, y ‘hang over’(malestar) por la mañana; así como también “sueños reales o vívidos” (Weathley, 2005).

## **2.3. Flavonoides.**

### **2.3.1. Aspectos generales.**

Los flavonoides (bioflavonoides) son constituyentes característicos de las plantas verdes, se encuentran tanto en forma libre o combinados en forma de glicósidos; éstos últimos contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas (Domínguez, 1979). Son metabolitos secundarios, compuestos de biogénesis mixta, generados por las rutas del ácido siquímico y acetato-malonato. Un derivado del ácido cinámico (fenilpropano), sintetizado del ácido siquímico, actúa como compuesto iniciador en la síntesis de policétidos, en donde se incorporan tres residuos de acetato a la estructura. (Figura 7). Esto es seguido del cierre del anillo con las subsecuentes hidroxilaciones y reducciones (Dewick, 1997, Di Carlo, et al., 1999, Julsing et al., 2006) dando origen a las diferentes clases de flavonoides, pero conservando el esqueleto base de quince átomos de carbono ordenados en la forma C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>.

Con base en la sustitución y el estado de oxidación del anillo C, los flavonoides se pueden clasificar en varias subclases que incluyen: flavonas, flavonoles, flavononas, flavanoles e isoflavonas (Figura 8) (Morris y Zhang, 2006).

En la naturaleza, la mayoría de los flavonoides existen como glicósidos (flavonoides que tienen uno o más residuos de azúcar unidos al anillo) (Figura 8), pero son las agliconas (flavonoides libres de moléculas de azúcar) las que generalmente se absorben desde el tracto gastrointestinal debido a su hidrofobicidad. Los glicósidos son hidrolizados solamente en el colon por microorganismos de la flora normal. Se conoce muy poco del metabolismo subsecuente a la absorción en animales, y en humanos no se tienen datos certeros; sólo se sabe que es el hígado el que en gran parte es responsable del metabolismo de los flavonoides absorbidos, así como la pared intestinal y el riñón pero en menor grado (Morris y Zhang, 2006).

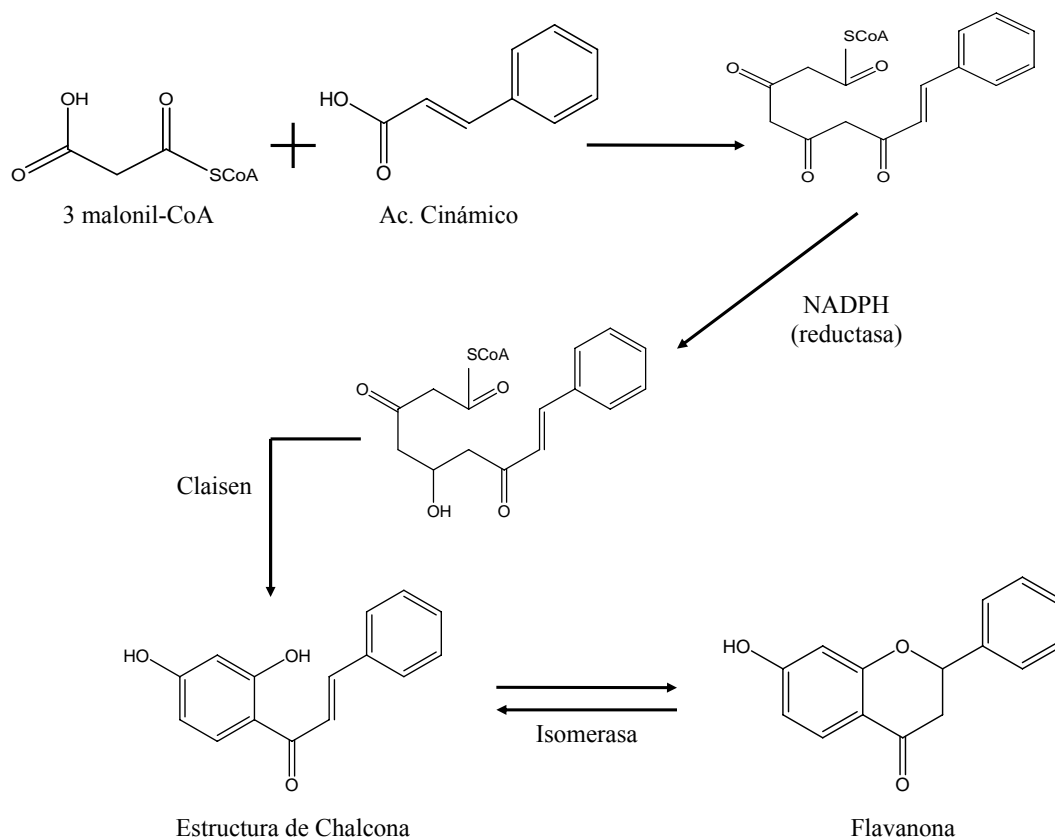


Figura 7. Biosíntesis de los flavonoides.

La diversidad en sus estructuras químicas les da un amplio rango de actividades biológicas. En plantas, su función parece estar ligada a la protección contra la radiación ultravioleta, la invasión microbiana, de insectos y de animales herbívoros (Fernández et al., 2006).

En humanos, se les ha atribuido efectos como: antioxidantes, antialérgicos, antiinflamatorios, antitóxicos, protectores hepatotóxicos, inhibidores de algunas enzimas como la aldosa reductasa y la xantina oxidasa, anticarcinogénicos, agentes antiosteoporóticos, antiulcerosos, antiespasmódicos, antiseoretos o antidiarreicos (Paladini et al., 1999; Morris y Zhang, 2006).

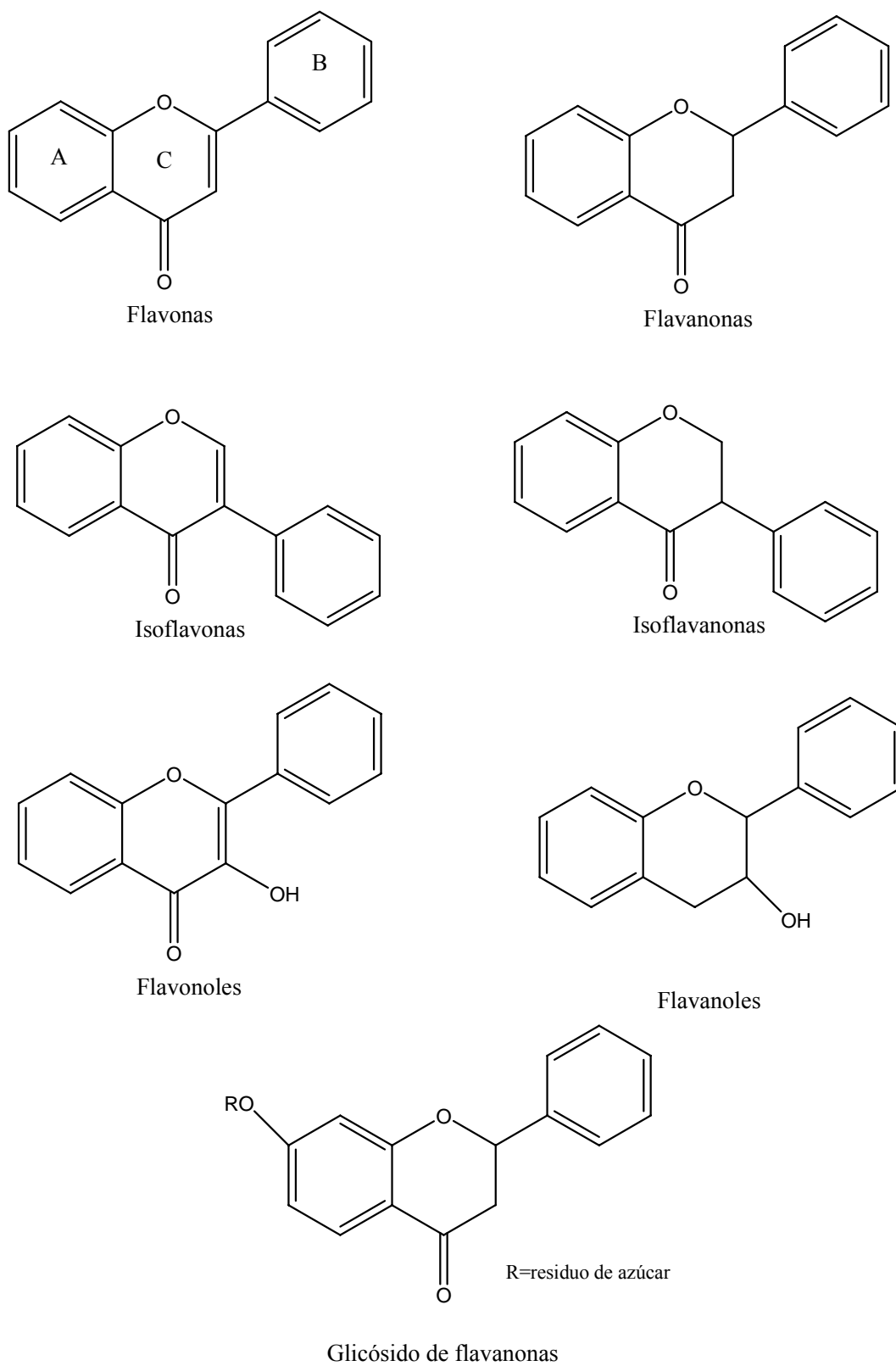


Figura 8. Estructuras químicas de flavonoides.

Los flavonoides son componentes comunes de nuestra dieta, particularmente, se encuentran en abundancia en vegetales, frutas y bebidas derivadas de plantas tales como el vino y el té (Morris y Zhang, 2006); por lo anterior sabemos que ésta interacción entre flavonoides provenientes de plantas y el hombre se ha dado desde hace mucho tiempo y últimamente ha despertado el interés para su estudio desde el punto de vista bioquímico, fisiológico, y en nuestro caso, farmacológico.

Se han descrito más de 5000 diferentes flavonoides y muchos de ellos se han estudiado. Pero como ansiolíticos se han descrito solo algunos como la crisina, aislada de *Pasiflora coerulea*; la apigenina, aislada de *Matricaria recutita*; así como también el cirsiol, aislado de *Salvia guaranítica* (Paladini et al., 1999).

### **2.3.2. Flavonoides con acción sobre el sistema nervioso central.**

Los flavonoides se encuentran en la naturaleza en su forma glicosilada, pero los estudios de los glicósidos de flavonoides son pocos, menos aún se conocen estudios con acción en el sistema nervioso central. Kang et al., 2000, aislaron de las flores de *Albizia julibrissin*, a la quercitrina e isoquercitrina, glicósidos de flavonoles, y detectaron que tienen actividad sedante en ratones. También de *Salvia guaranítica*, se ha aislado el cirsiol, al cual se le atribuyen propiedades hipnóticas y sedantes (Paladini et al., 1999).

Du et al., en 2002, reportan que la goodyerina aislada de la *Goodyera schlechtendaliana*, posee actividad sedante y anticonvulsiva en ratones. Por su parte Datta et al., 2004, describe que el glicósido de flavonol, quercetin-3-O-(6'-feruloil)- $\beta$ -D-galactopiranosido aislado de las partes aéreas de *Polygonum viscosum*, presenta actividad depresora del sistema nervioso central (Fernández et al., 2006). Se han estudiado también las agliconas de algunos flavonoides pero éstas presentan muy poca o nula actividad a diferencia de los flavonoides glicosilados.

Existen flavonoides aislados de la especie de *Valeriana* y que tienen acción sobre el sistema nervioso central como la linarina. La linarina es un flavonoide presente en forma de glicósido en *V. officinalis*, con propiedades sedantes e inductor del sueño, pero al mismo tiempo se ha demostrado que a dosis de 100 mg/kg tiene efectos sobre la actividad locomotora inhibiéndola, y a mayores dosis produce toxicidad. La linarina

además presenta un efecto de potenciación con el ácido valérico presente también dentro de la *Valeriana* (Fernández et al., 2004).

Por otra parte se ha aislado de *Valeriana wallichii*, la 6- metilapigenina, compuesto al cual por medio de estudios competitivos para el sitio de unión de las benzodiazepinas al receptor GABA<sub>A</sub> en cerebro, se le asigna como un compuesto agonista competitivo (Wasowski et al., 2002).

La hesperidina y la 6-metilapigenina, son flavonoides activos aislados de *V. officinalis* y *V. wallichii*, y que tiene también su efecto sobre el sistema nervioso central, ya que la primera tiene propiedades sedantes e incrementa el periodo de sueño, y la segunda es capaz de potenciar las propiedades de inducción de sueño de la hesperidina (Fernández et al., 2004, Marder et al., 2003). La 6-metilapigenina junto con la hesperidina pudieran explicar las propiedades de *V. officinalis* y *V. wallichii*; por lo que ambos son candidatos a ser fármacos líderes ('drug leads') (Marder et al., 2003).

## **2.4. Flavonoide Hesperidina.**

### **2.4.1. Aspectos dentro del sistema nervioso central.**

Es bien conocido que numerosos flavonoides poseen diversas actividades sobre diferentes sistemas, sin embargo, no se conoce mucho acerca de la actividad de los flavonoides sobre el sistema nervioso central.

Marder et al., en 2003 reportan haber aislado la 2S(-) hesperidina de *Valeriana wallichii* D.C y detectaron a este flavonoide en *Valeriana officinalis* L. Por medio de estudios en ratones y utilizando diferentes modelos como el modelo de cruz elevada, modelo de campo abierto con hoyos (holeboard test), tiempo de sueño inducido por tiopental, así como modelos para observar la actividad motora y la miorelajación, establecieron que dicho flavonoide tiene acción sedante y que incrementa el tiempo de sueño inducido por tiopental.

Para establecer el posible mecanismo de acción de este nuevo flavonoide encontrado en la especie *Valeriana*, realizaron estudios de unión a diferentes ligandos como: al sitio de unión de benzodiazepinas, al receptor 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, a los receptores AMPA y a receptores de adenosina<sub>1</sub>; sin embargo los resultados arrojados demostraron

que la 2S(-)hesperidina no es ligando pa ninguno de los receptores estudiados por lo que su mecanismo de acción aún no está claro.

Todos los estudios realizados por Marder et al., (2003), fueron determinados tanto con la 2S(-) hesperidina aislada de la valeriana como con la hesperidina de Sigma Co., la cual es obtenida de cítricos, y encontraron que existe una diferencia en la acción siendo más activa la aislada de valeriana. La explicación para esto es que, en la muestra comercial obtenida de cítricos, la hesperidina se encuentra en forma de mezcla racémica, aunque dentro de ésta mezcla el 60% corresponde al isómero 2S(-), por lo que también presenta actividad pero en menor magnitud.

Otros estudios realizados por Wasowski et al (2002), demuestran la presencia de otro flavonoide en *Valeriana wallichii*, la 6-metilapigenina, la cuál en el estudio realizado después por Marder et al. en 2003, demuestra una actividad sinergista al administrarse conjuntamente a la hesperidina. Este aparente sinergismo quizá podría dar explicación al efecto sedante y tranquilizante de la valeriana.

Se ha encontrado un estudio de interacción entre el flavonoide hesperidina y el diacepam realizado por Fernández et al. (2005), donde se muestra que ocurre una potenciación cuando la hesperidina interactúa con otros ligandos al sitio de unión a benzodiazepinas, pues se incrementa el tiempo de sueño inducido por tiopental. Aunque en este estudio se muestra que tanto la hesperidina como el diacepam administrados independientemente por vía intraperitoneal en ratones presentan similar eficacia, sus efectos máximos no son significativamente diferentes y sus DE<sub>50</sub> también son similares. La determinación de esta potenciación fue realizada por medio de un análisis isobolográfico donde las proporciones de dosis estudiadas de hesperidina:diacepam fueron 13:1, 4:1 y 1:13, respectivamente, utilizando la hesperidina comercial que contiene un 60% de la forma 2S(-). Además de acotar que el efecto sinergista entre ellos se presenta cuando la cantidad de hesperidina, en la proporción de dosis administrada, es mayor que la cantidad del diacepam.

#### **2.4.2. Aspectos químicos y farmacológicos**

La hesperidina es un flavonoide descubierto en 1827, aunque no en un estado puro, por Lebreton, y desde entonces ha estado en continua investigación, lo cual ha



llevado a atribuirle diferentes actividades. Se encuentra presente en grandes cantidades en los cítricos tales como la naranja dulce y el limón (familia Rutacea), por lo que es muy común encontrar a la hesperidina asociada a la vitamina C. Su presencia también se ha demostrado en otras familias no cítricas como en la Fabaceae, Betulaceae, Lamnaceae, Araliaceae y Papilionaceae.

Di Mauro et al en 1999 describió un procedimiento para obtener hesperidina de los desechos de la cáscara de la naranja producido por la industria de cítricos (Garg et al., 2001).

La hesperidina pura ( $C_{18}H_{34}O_{15}$  y p.m = 610.57 DA) se presenta en forma de agujas delgadas largas, con color amarillo pálido y con punto de fusión de 258-262°C y presenta una absorción máxima en UV a 286 nm.

Es un glicósido de flavanona, que se compone de la aglicona hesperetina, y el disacárido rutinosa (ramnosa + glucosa). En otras palabras en la estructura de la hesperidina, la glucosa se encuentra unida a la hesperetina, y la ramnosa está unida a la glucosa como se muestra en la Figura 9 (Garg et al., 2001).

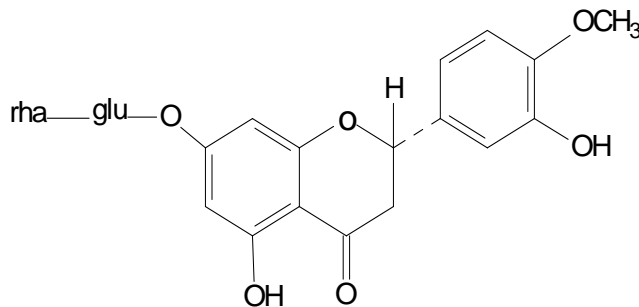


Figura 9. Estructura química de la hesperidina (hesperetin-7-ramnoglucósido).

En la literatura se encuentran reportes de los estudios que se han realizado donde se ha encontrado que la hesperidina posee diversas actividades las cuales se enlistan en el Cuadro 1 (Deng et al., 1997; Lee et al., 1999; Phantong et al., 2006 ; Garg et al., 2001).

Cuadro 1. Actividades reportadas para el flavonoide hesperidina.

<b>Actividad</b>
Anti-inflamatoria, analgésica y venotónica, para el tratamiento contra las hemorroides
Incrementa la resistencia capilar, lo que se atribuye a la inhibición de la hialuronidasa, en el tratamiento de anomalías en la fragilidad capilar
Antipirética
Antibacterial contra <i>Helicobacter pylori</i> ,
Antifúngica contra <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Trichoderma glaucum</i> y <i>Aspergillus fumigatus</i> .
Antiviral contra virus de la influenza, actividad leve sobre el virus del herpes
Reduce la replicación intracelular del virus simple del herpes tipo I (HSV-1), y virus $\alpha$ -herpes tipo I (virus de <i>Pseudorabies</i> )
Bloquea el canal de calcio
Acción hipocolesterolemica considerable, así como también disminuye las proteínas de baja densidad (LDL), lípidos totales y triglicéridos en ratas normolipidémicas, y aumenta las proteínas de alta densidad (HDL).
Inhibe la lipasa pancreática
Depresora del miocardio en adultos
Efecto antihipertensivo y diurético en ratas, por administración oral
La hesperidina o sus productos metabólicos inhiben la liberación de histamina de los basófilos
En combinación con diosmin tiene acción en: procesos propios de la inflamación como diapedesis de polimorfos, linfocitos, histocitos y macrófagos, así como también en reacciones de la inflamación crónica.
La hesperidina, la hesperidina sulfonada y la hesperidina fosforilada inhiben a la hialuronidasa, siendo más potentes las dos últimas
Inhibe diferentes enzimas como: la acrosina (in vitro), aldosa reductasa (in vitro), fosfatasa alcalina (suero de rata), débilmente a la $\alpha$ -glucosidasa (in vitro), inhibe la lipólisis inducida por epinefrina, pero no inhibe significativamente a las fosfodiesterasas con AMPc como sustrato.
Sola y en combinación con diosmin inhibe prostaglandinas en ratas
Hesperidina fosforilada efectivo agente anticonceptivo, debido a que inhibe la enzima hialuronidasa en ratones. En humanos la inhibición es por 48 hrs. sin producir toxicidad y restableciendo la fertilidad después de éste periodo.
Inmunosupresora

Cuadro 1 (continuación). Actividades reportadas para el flavonoide hesperidina.

Inhibe la carcinogénesis en ratas, debido a que incrementa la supresión de proliferación celular.
Actividad nula o muy leve como antioxidante y atrapador de radicales libres.
Inhibe la agregación de eritrocitos.
Efecto antiisquémicos en cerdos de guinea y hamsters.
Antialérgica y antianafiláctica.
Incrementa significativamente la memoria inmunológica en la respuesta inmune celular.
Antiulceroso por vía oral, en úlceras producidas por estrés.

## 2.5. Análisis isobolográfico.

### 2.5.1. Aplicaciones y ventajas del análisis. (Tallarida, 2000)

La metodología cuantitativa para estudiar combinaciones químicas biológicamente activas, comenzó aplicándose en venenos. El método isobolográfico tuvo sus primeras aplicaciones en estudios de análisis de toxicidad de insecticidas y fungicidas, y ese uso, posteriormente condujo a aplicaciones farmacológicas más amplias y a nuevos progresos estadísticos.

Hoy en día los libros más comunes de farmacología, aun no incluyen entre sus temas, métodos cuantitativos para estudiar combinaciones de fármacos. Sin embargo en años recientes este tema esta siendo cada vez más apreciado por más y más farmacólogos, especialmente aquellos que estudian fármacos que afectan el sistema nervioso central, para alterar la percepción del dolor, el comportamiento, la locomoción, y el estado de ánimo.

De hecho varios fármacos que tienen su acción sobre el sistema nervioso central son del tipo de fármacos que tienden a ser de abuso entre las personas que los toman, quizá por eso sea el creciente uso del método isobolográfico por los investigadores. Es bien sabido que las personas que abusan de una droga, rara vez hacen uso solo un tipo de fármaco, sino que, el abuso es con múltiples fármacos.

Los fármacos utilizados adecuadamente también presentan interacciones, de tal modo que pueden incrementar los efectos deseados y los no deseados también. Aparte de

la importancia clínica, se empieza a reconocer, que el estudio cuantitativo de las combinaciones de fármacos, especialmente cuando se detecta sinergismo, puede ser un primer paso muy útil, para elucidar el mecanismo de acción.

### 2.5.2. Fundamento y bases estadísticas para el análisis.

Dos o más fármacos que producen efectos similares o iguales, a menudo se prescriben en combinación para reducir las dosis individuales y/o para reducir los efectos adversos de cada uno. Las combinaciones de fármacos también se emplean en experimentos para descubrir y explorar su mecanismo de acción (Tallarida et al., 1997a).

Cuando dos sustancias con efecto similar se administran juntas, el efecto combinado puede ser una simple adición de los efectos individuales e independientes, a lo cual se le nombra *aditividad*. En contraste, el efecto de la combinación puede ser exagerado o incluso atenuado. El efecto exagerado es nombrado *super-aditividad* o sinergismo, en tanto que el efecto atenuado se nombra *sub-aditividad*. En cualquiera de los casos los compuestos individualmente contribuyen al efecto pero algo ocurre al ponerlos juntos que aumenta o disminuye el efecto esperado de ambos (Tallarida, 2000).

El estudio entre sustancias activas se puede realizar utilizando el análisis isobolográfico, el cual permite realizar una evaluación rigurosa de la interacción entre dos sustancias activas. El isobograma proporciona una representación visual de las dosis teóricas aditivas (y de los pares experimentales) y además es adecuado para mostrar los resultados (Tallarida et al., 1997a; Tallarida, 2000).

Un isobograma (Figura 10) es una gráfica en coordenadas rectangulares de: los pares de dosis o concentraciones ( $a$ ,  $b$ ), de las sustancias respectivas que producen el nivel o efecto específico (por ejemplo  $DE_{50}$ ,  $DE_{70}$ ,  $DE_{30}$ , etc.) cuando se aplican en forma conjunta, y de la línea de aditividad la cual representa todas las posibles combinaciones equivalentes para producir el efecto deseado (Tallarida et al. 1997a; Tallarida, 2000).

Como se observa en la Figura 10. la línea de aditividad está definida por los puntos  $(Z_1^*, 0)$  y  $(0, Z_2^*)$ . Siendo  $Z_1^*$  la concentración del compuesto menos activo, y  $Z_2^*$  la concentración del compuesto más activo y que producen individualmente el mismo

nivel de efecto. En este método el valor de  $Z^*$  para cada fármaco, se calcula de la región de la curva dosis-respuesta en donde existe una clara relación entre la dosis y el efecto y que pueden relacionarse linealmente, aunque también puede existir una relación no lineal y entonces se puede utilizar el análisis no lineal de  $Z^*$  (Tallarida, 2000). Se calcula la  $Z^*$  para cada fármaco de la regresión lineal del efecto en función del logaritmo de la dosis, de donde se obtienen el  $\log Z^*$  y el error estándar del estimado SE ( $\log Z^*$ ) para cada fármaco, que posteriormente se utilizará para realizar el análisis estadístico (Tallarida et al., 1997b).

Todos los puntos sobre la línea de aditividad, que tienen las coordenadas  $(a, b)$ , donde  $a$  y  $b$  son las fracciones de dosis respectivas ( $Z_1^*$  y  $Z_2^*$ ) en la combinación binaria (Tallarida, 2000) del fármaco A y del fármaco B que provocan el mismo nivel de efecto de los fármacos sin combinarse y que satisfacen la ecuación:

$$a/A + b/B = 1$$

en donde  $A$  y  $B$  son las dosis equiefectivas ( $Z_1^*$  y  $Z_2^*$  que producen el mismo nivel de efecto) de los fármacos individuales cuando cada uno está presente solo. Los pares de dosis equiefectivas son denominadas *isobolas*, de tal forma que  $(A, 0)$ ,  $(0, B)$  y los pares  $(a, b)$  son isobolas. Cuando la combinación de la dosis  $a$  del fármaco A y la dosis  $b$  del fármaco B cumplen con la relación  $a/A + b/B = 1$  se dice que los fármacos A y B presentan una relación *aditiva*. La relación  $a/A + b/B < 1$  indica la relación *superaditiva* entre los fármacos A y B, en tanto que la relación  $a/A + b/B > 1$ , indica la relación *subaditiva* entre los fármacos A y B (Tallarida, 2000).

En el análisis isobolográfico primero se determinan las dosis o concentraciones que provocan un determinado nivel de efecto ( $Z^*$ ) de cada fármaco. Generalmente este nivel es el 50% del máximo nivel ( $DE_{50}$ ) con su intervalo de confianza al 95%, aunque se puede utilizar otro nivel siempre y cuando éste sea proporcionado por cada fármaco (Tallarida, 2000).

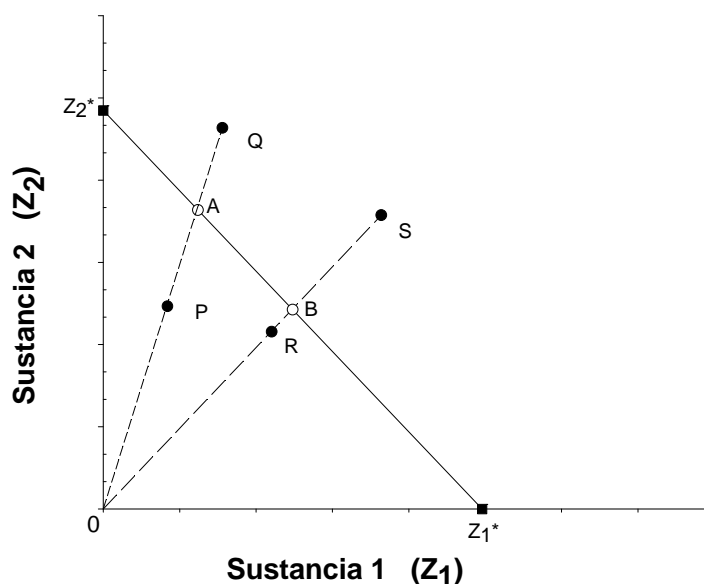


Figura 10. Isoblograma en donde la línea continua es la línea de aditividad para la sustancia 1 y 2;  $Z_1^*$   $Z_2^*$  son las dosis equiefectivas individuales. Los puntos A y B representan las cantidades teóricas aditivas ( $Z_{ad}$ ). P y R son puntos que representan las cantidades experimentales ( $Z_{exp}$ ) con un efecto superaditivo, en tanto que Q y S son puntos que representan las cantidades experimentales ( $Z_{exp}$ ) con un efecto subaditivo. Las líneas radiales discontinuas 0-Q y 0-S representan las combinaciones de las sustancias en diferentes proporciones.

La  $Z^*$  del fármaco A se denotará como A y la  $Z^*$  del fármaco B, se denotará B. Las cantidades en la combinación aditiva son fracciones de la dosis de cada compuesto tal que la suma de las fracciones sea igual a la unidad; así entonces  $a = fA$  del fármaco A y  $b = (1-f)B$  del fármaco B. En otras palabras, para que sea una combinación aditiva se debe cumplir con la relación  $a/A + b/B = 1$ .

Cuando estas cantidades son expresadas en unidades de masa comunes (mg o  $\mu\text{g}$ ) o dosis (mg/kg) la cantidad total en la mezcla es la suma denominada  $Z_{ad}$ :

$$Z_{ad} = fA + (1-f)B$$

Esta relación representa la cantidad teórica de la combinación que dará una interacción aditiva. Las proporciones de cada fármaco en la mezcla estarán dadas por:  $\rho_A = fA/Z_{ad}$  y  $\rho_B = (1-f)B/Z_{ad}$  respectivamente (Tallarida,2000).

La combinación que resulte con estas proporciones se administra experimentalmente al sistema biológico, como si fuese un tercer fármaco. Esto es, se administra en diferentes dosis o concentración conservando la misma proporción ( $\rho$ ). Se calcula la dosis o concentración que proporciona el mismo nivel de efecto que los fármacos individuales y a este valor se le denomina  $Z_{exp}$  (cantidad experimental que provoca el mismo nivel del efecto). Se calcula también el intervalo de confianza al 95%, que posteriormente se transforma en el error estándar de la media (EEM).

Se realiza el análisis estadístico a la diferencia  $M = \log Z_{ad} - \log Z_{exp}$ . Si la diferencia no es significativamente diferente de cero se concluye que la combinación es una simple adición del efecto de cada uno de los fármacos. En contraste, una diferencia significativa indicará una relación no aditiva entre los dos fármacos como sigue: se establecerá una relación de superaditividad o sinergista si  $Z_{exp} < Z_{ad}$  ( $M > 0$ ) y una relación de subaditividad si  $Z_{exp} > Z_{ad}$  ( $M < 0$ ). Se aplica un análisis estadístico basado en la prueba t de Student con algunas modificaciones para aplicarse al análisis isobolográfico (Tallarida et al., 1997a; Tallarida, 2000).

La prueba de significancia de la diferencia  $M = \log Z_{ad} - \log Z_{exp}$ , brevemente consiste en determinar el valor de  $t'$  dado por:

$$t' = M / [\text{SE}(Z_{ad}^*)^2 + \text{SE}(Z_{exp}^*)^2]^{1/2}$$

En la ecuación anterior  $Z_{ad}$  se refieren a los valores aditivos y  $Z_{exp}$  a los valores experimentales. Los errores estándar estimados se calculan con la relación:  $\text{SE}(Z^*) = 2.3 \times Z^* \times \text{SE}(\log Z^*)$ , con lo que se calculan las varianzas respectivas:  $V(Z^*) = [\text{SE}(Z^*)]^2$ .

La varianza de  $Z_{ad}^*$  está dada por  $V(Z_{ad}^*) = f^2V(Z_1^*) + (1-f)^2V(Z_2^*)$ , de esta relación se obtiene el error estándar de  $Z_{ad}$ :  $\text{SE}(Z_{ad}^*) = [V(Z_{ad}^*)]^{1/2}$

Conociendo el valor de  $Z_{ad}$  y  $Z_{exp}$  con sus respectivos errores estándar, se calcula el valor de  $t'$  y se compara con el valor de  $T$  dado por:

$$T = [t_{ad} (SE(Z_{ad}^*))^2 + t_{ex} (SE(Z_{exp}^*))^2] / [SE(Z_{ad}^*)^2 + SE(Z_{exp}^*)^2]$$

El valor de  $t_{ad}$  es el valor en la tabla de distribución  $t$  con  $n_1 + n_2 - 2$  grados de libertad, en donde  $n_1$  y  $n_2$  son el número de dosis del fármaco 1 y fármaco 2 respectivamente que se utilizaron en el cálculo y  $t_{ex}$  es el valor en la tabla de distribución  $t$  para  $n_{ex} - 2$  grados de libertad, en donde  $n_{ex}$  es el número de dosis de la combinación. Si el valor absoluto de  $t'$  es mayor al valor de  $T$  ( $|t'| > T$ ) la diferencia es significativa (Tallarida, 2000).



### III. JUSTIFICACIÓN.

La hesperidina es un flavonoide, que se encuentra en grandes cantidades en los cítricos tales como la naranja dulce y el limón. También se ha demostrado su presencia en otras especies no cítricas como en la Betulaceae, Lamnaceae y Papilionaceae (Garg et al., 2001)

Estudios realizados por Marder et al. en 2003 demuestran la presencia de la hesperidina en *Valeriana officinalis* L. y *Valeriana wallichii* DC, y que éste flavonoide tiene propiedades sedantes además de incrementar el tiempo de sueño inducido por pentobarbital.

Así mismo, el análisis isobológico realizado por Ugalde et al. en 2005 presenta que el extracto hidroalcohólico de *Valeriana edulis* ssp *procera* y algunos fármacos depresores del sistema nervioso central, presentan una relación de tipo aditiva.

Por lo mencionado anteriormente este trabajo se enfoca al estudio, mediante el análisis isobológico, de la interacción entre el flavonoide hesperidina y algunos fármacos depresores del sistema nervioso central como son la buspirona, el diacepam, la difenhidramina, el etanol, el haloperidol y el pentobarbital, para establecer, si existe una interacción entre ellos, y determinar si es de tipo sinergista o inhibitoria, o si sólo presenta una relación aditiva.

Debido a que Fernández et al. (2005) reportan una interacción sinergista entre la hesperidina y el diacepam, este trabajo también servirá para comprobar o refutar éste tipo de interacción.

#### **IV. HIPÓTESIS.**

Por medio del análisis isobolográfico se espera encontrar una interacción de tipo sinergista del efecto sedante entre el flavonoide hesperidina y uno o varios de los siguientes fármacos depresores del sistema nervioso central: buspirona, diacepam, difenhidramina, etanol, haloperidol y pentobarbital cuando se administren simultáneamente en ratones.

## **V. OBJETIVO.**

- Realizar el análisis isobolográfico de la interacción entre la hesperidina y los fármacos depresores del sistema nervioso central: buspirona, diacepam, difenhidramina, etanol, haloperidol y pentobarbital, en ratones macho ICR utilizando el modelo del cilindro de exploración para evaluar el efecto sedante.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODO.**

### **6.1. Fármacos y sustancias.**

La buspirona, la difenhidramina, el haloperidol, y la hesperidina fueron adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis Mo. USA). El pentobarbital (Anestesal), fue adquirido de Pfizer S.A. de C.V. (México) y el diacepam (Valium) de Roche S.A. de C.V.

El etanol utilizado fue alcohol etílico absoluto anhidro de J.T. Baker. El tween 80 fue adquirido de HYCEL de México, S.A. de C.V.

### **6.2. Dosificación.**

Los fármacos fueron disueltos en solución salina isotónica (0.9%), con excepción del diacepam, el haloperidol y la hesperidina que fueron suspendidos con una gota de tween 80 en solución salina isotónica.

Las muestras se prepararon al momento de uso y se administró vía intraperitoneal un volumen de 0.1 mL de muestra por cada 10 g de peso corporal del animal.

Para los grupos control, se administro el mismo volumen de vehículo: tween 80 en solución salina y solución salina, o ambos de tween 80 en solución salina, según el caso.

### **6.3. Animales.**

Para todos los experimentos se utilizaron ratones machos ICR de 25-30 g de peso adquiridos del Centro de Producción UNAM-Harlan, Harlan México, S.A. de C.V. Los procedimientos donde fueron involucrados animales se llevaron a cabo conforme a la Norma Oficial Mexicana sobre el Cuidado y Manejo de Animales (NOM-062-ZOO-1999), cumpliendo además con las reglas internacionales para el uso y cuidado de animales de laboratorio

Los grupos experimentales para el estudio de interacción, estuvieron conformados por 6 animales. Los animales se mantuvieron en un cuarto a temperatura ambiente de  $22 \pm 2$  °C y sometidos a un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, con libre

acceso a alimento y agua. Todas las evaluaciones fueron realizadas entre las 9:00 y 14:00 hrs.

#### **6.4. Procedimiento de la evaluación del efecto sedante.**

El experimento se realiza en un cuarto, a temperatura y luz constante, apartado del ruido exterior.

##### **6.4.1. Modelo de Cilindro de Exploración:**

El aparato consiste en un cilindro de vidrio de 30 cm de alto por 11 cm de diámetro, y 3 mm de espesor. El cilindro se coloca en una superficie plana sobre un papel que cubra la superficie; cada individuo se coloca por un lapso de 5 minutos dentro del cilindro y durante este tiempo se cuenta el número de levantamientos espontáneos que realiza el animal sobre sus extremidades posteriores en un período de 5 minutos.

Entre cada animal que se estudia, se cambia el papel que cubre el fondo del cilindro y se limpia el interior del cilindro con solución etanólica al 10%.

La administración se realiza 30 minutos antes de la prueba, con excepción de la buspirona que se administra 20 minutos antes y del etanol que se administra 5 minutos antes de la misma. La hesperidina se administra del lado derecho de la cavidad peritoneal, y enseguida se inyecta el fármaco prueba, del lado izquierdo.

Durante la observación, el experimentador debe permanecer sentado junto al aparato siempre en el mismo lugar. La disminución en el número de levantamientos, con respecto al control, indica un efecto sedante (Ugalde et al., 2005).

#### **6.5. Determinación de las curvas dosis-respuesta.**

Las curvas dosis-respuesta se construyeron para evaluar el efecto sedante de los fármacos depresores del SNC cuando se administran en combinación con la hesperidina. Se determinó la curva dosis-respuesta en las tres proporciones evaluadas con las dosis que se muestran en el Cuadro 3. La dosis que provocó 50% del efecto sedante (DE<sub>50</sub>, reducción del 50% en el número de levantamientos espontáneos en relación al grupo control) y su

intervalo de confianza al 95% asociado, se calculó utilizando el análisis de regresión lineal del logaritmo de la dosis como variable independiente y la respuesta como variable dependiente (Tallarida, 2000).

### 6.6. Análisis de la interacción.

Se realizó un análisis isobolográfico para caracterizar la interacción de la hesperidina con la buspirona, el diacepam, la difenhidramina, el etanol, el haloperidol y el pentobarbital. Para el análisis sólo se consideraron las dosis equiefectivas ( $DE_{50}$ ) de cada fármaco individual (Cuadro 2) obtenidas de las curvas dosis-respuesta obtenidas en un trabajo previo (Ugalde et al., 2005) en este mismo laboratorio, exceptuando la dosis equiefectivas ( $DE_{50}$ ) del diacepam y de la hesperidina las cuales fueron obtenidas en este estudio de las curvas dosis respuesta para cada una de ellas. Las dosis aditivas teóricas ( $Z_{ad}$ ) con su error estándar de la media (EEM) para cada combinación y en la misma proporción (1:1) se calcularon de las dosis equiefectivas ( $DE_{50}$ ) de los fármacos individuales y de acuerdo al método descrito por Tallarida et al. (1992) para satisfacer la ecuación:  $Z_{ad} = f A + (1-f) B$ , en donde  $A$  fue la  $DE_{50}$  de la hesperidina y  $B$  fue la  $DE_{50}$  del fármaco depresor del SNC en la combinación. Para este caso el valor  $f A = a$  representa la fracción de la  $DE_{50}$  de la hesperidina en la combinación y  $(1-f) B = b$  representa la fracción de la  $DE_{50}$  del fármaco depresor del SNC en la combinación (Tallarida, 2000).  $Z_{ad}$  representa la dosis aditiva total de los fármacos que teóricamente provocan una reducción del 50% en el número de levantamientos en los ratones respecto al número de levantamientos del grupo control.

Cuadro 2. Valores de  $DE_{50} \pm$  error estándar de la media, de la hesperidina y algunos fármacos depresores del sistema nervioso central en ratones ICR.

Fármaco	$DE_{50} \pm$ EEM (mg/kg)
hesperidina	24,80 $\pm$ 10,47
buspirona	1,04 $\pm$ 0,17
diacepam	3,14 $\pm$ 0,45
difenhidramina	17,06 $\pm$ 0,67
etanol	1938,83 $\pm$ 126.35
haloperidol	0,41 $\pm$ 0,06
pentobarbital	11,86 $\pm$ 0,68

Las proporciones que se estudiaron fueron 1:3, 1:1 y 3:1, correspondiendo a los valores de  $f$  y  $(1-f)$  de 0.25 : 0.75, 0.5 : 0.5, 0.75 : 0.25 respectivamente. Las proporciones para cada fármaco y las dosis en mg/kg probadas en cada proporción, se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Dosis utilizadas en el estudio de la interacción sedante entre la hesperidina y algunos fármacos depresores del SNC en ratones machos ICR.

Proporción	Fármaco depresor del SNC	Dosis (mg/kg)		
		Fármaco depresor del SNC	Hesperidina	Dosis Total (mg/kg)
1: 3	Buspirona	0.06	4.65	4.71
		0.13	9.30	9.43
		0.26	18.60	18.86
		0.52	37.20	37.72
		1.04	74.40	75.44
	Diacepam	0.19	4.65	4.84
		0.39	9.30	9.69
		0.78	18.60	19.38
		1.57	37.20	38.77
		3.14	74.40	77.54
	Difenhidramina	1.06	4.65	5.71
		2.13	9.30	11.43
		4.26	18.60	22.86
		8.53	37.20	45.73
		17.06	74.40	91.46
		21.32	93.00	114.32
	Etanol	121.17	4.65	125.82
		242.35	9.30	251.65
		484.70	18.60	503.30
		969.41	37.20	1006.61
		1938.83	74.40	2013.23
	Haloperidol	0.03	4.65	4.68
		0.05	9.30	9.35
		0.10	18.60	18.70
		0.20	37.20	37.40
		0.41	74.40	74.81
	Pentobarbital	0.74	4.65	5.39
		1.48	9.30	10.78
2.96		18.60	21.56	
5.93		37.20	43.13	
11.86		74.40	86.26	
23.72		148.80	172.52	
47.44		297.60	345.04	
94.88	595.2	690.08		

Cuadro 3 (continuación). Dosis utilizadas en el estudio de la interacción sedante entre la hesperidina y algunos fármacos depresores del SNC en ratones machos ICR.

Proporción	Fármaco depresor del SNC	Dosis (mg/kg)		
		Fármaco depresor del SNC	Hesperidina	Dosis Total (mg/kg)
1:1	Buspirona	0.13	3.10	3.23
		0.26	6.20	6.46
		0.52	12.40	12.92
		2.08	49.60	51.68
		4.16	99.20	103.36
	Diacepam	0.39	3.10	3.49
		0.79	6.20	6.99
		1.57	12.40	13.97
		3.14	24.80	27.94
		6.28	49.60	55.88
	Difenhidramina	2.13	3.10	5.23
		4.26	6.20	10.46
		8.53	12.40	20.93
		17.06	24.80	41.86
		35.20	49.60	84.80
	Etanol	242.35	3.10	245.45
		484.71	6.20	490.91
		969.42	12.40	981.82
		1938.83	24.80	1963.63
		3877.66	49.60	3927.26
	Haloperidol	0.05	3.10	3.15
		0.10	6.20	6.30
		0.20	12.40	12.60
		0.41	24.80	25.21
		0.82	49.60	50.42
	Pentobarbital	1.48	3.10	4.58
		2.97	6.20	9.17
		5.93	12.40	18.33
11.86		24.80	36.66	
23.72		49.60	73.32	



Cuadro 3 (continuación). Dosis utilizadas en el estudio de la interacción sedante entre la hesperidina y algunos fármacos depresores del SNC en ratones machos ICR.

Proporción	Fármaco depresor del SNC	Dosis (mg/kg)		
		Fármaco depresor del SNC	Hesperidina	Dosis Total (mg/kg)
3:1	Buspirona	0.19	1.55	1.74
		0.39	3.10	3.49
		0.78	6.20	6.98
		1.56	12.40	13.96
		3.12	24.80	27.92
	Diacepam	0.58	1.55	2.13
		1.17	3.10	4.27
		2.35	6.20	8.55
		4.71	12.40	17.11
		9.42	24.80	34.22
	Difenhidramina	3.19	1.55	4.74
		6.39	3.10	9.49
		12.79	6.20	18.99
		25.59	12.40	37.99
		51.18	24.80	75.98
	Etanol	363.53	1.55	365.08
		727.06	3.10	730.16
		1454.12	6.20	1460.32
		2908.24	12.40	2920.64
		5816.49	24.80	5841.29
	Haloperidol	0.07	1.55	1.62
		0.15	3.10	3.25
		0.30	6.20	6.50
		0.61	12.40	13.01
1.23		24.80	26.03	
Pentobarbital	2.22	1.55	3.77	
	4.44	3.10	7.54	
	8.89	6.20	15.09	
	17.79	12.40	30.19	
	35.58	24.80	60.38	

La  $Z_{exp}$  es la dosis total determinada experimentalmente de una mezcla de dos componentes, que se administró combinada en las proporciones fijas arriba mencionadas, en una cantidad suficiente para reducir el número de levantamientos de los ratones en un 50% con respecto al grupo control. El valor  $Z_{exp}$  (con sus intervalos de confianza al 95%) se determinó de la curva dosis-respuesta respectiva de los fármacos combinados, por un análisis de regresión lineal de la curva logaritmo de la dosis contra la respuesta (Tallarida, 2000). Los intervalos de confianza al 95% se transformaron en el EEM.

### 6.7. Análisis estadístico.

La comparación del valor  $Z_{exp}$  con el valor de  $Z_{ad}$  se realizó mediante un análisis estadístico basado en la prueba t de Student con algunas modificaciones para aplicarse al análisis isobolográfico (Tallarida et al., 1997a; Tallarida, 2000). Para este análisis se utiliza el valor del EEM de cada valor de la  $DE_{50}$ , motivo por el cual fue necesario transformar el valor del intervalo de confianza al 95% en el EEM. Los valores de  $Z_{exp}$  que fueron menores al valor de  $Z_{ad}$ , con un valor de  $p < 0.05$  para la diferencia en ambas direcciones X y Y, se interpretaron como la existencia de una interacción *superaditiva* significativa. Para valores de  $Z_{exp}$  mayores a  $Z_{ad}$  con un valor de  $p < 0.05$  para la diferencia en ambas direcciones X y Y, se interpretaron como la existencia de una interacción *subaditiva* significativa. Cuando no hubo diferencia estadística significativa entre los valores de  $Z_{exp}$  y  $Z_{ad}$ , se interpretó como la ausencia de interacción, declarándose que existe una relación aditiva en la combinación (Tallarida, 2000).

Para obtener un valor que describa la magnitud de la interacción, se realizó un análisis fraccional para cada combinación, utilizando los valores de la  $DE_{50}$  de la hesperidina, del fármaco depresor del SNC y de la combinación, de acuerdo a la relación:  $a/A + b/B$ , donde A y B son los valores de las  $DE_{50}$  cuando cada fármaco o la hesperidina actúan solos, y a y b son las cantidades cuando cada fármaco actúa en la combinación. Este valor de la fracción total mide la divergencia entre el valor de la dosis experimental ( $Z_{exp}$ ) de la combinación y el valor de la dosis teórica ( $Z_{ad}$ ) equiefectiva (Tallarida, 2000).

La demostración de diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) de 1 para la relación  $a/A + b/B$  se interpretó como una interacción superaditiva si  $a/A + b/B$  fue  $< 1.0$ , y como una interacción subaditiva si  $a/A + b/B$  fue  $> 1.0$ ; la ausencia de una diferencia estadística ( $p > 0.05$ ) se interpretó como un efecto aditivo (Tallarida, 2000).

### **6.8. Representación gráfica de la interacción.**

La representación gráfica de las interacciones en forma de isobolas (curvas isoefectivas o isobologramas), que es una forma simple de visualizar las interacciones, facilitaron la interpretación de las interacciones entre la hesperidina y cada uno de los fármacos depresores del SNC estudiados. El isoblograma fue construido conectando el valor de la  $DE_{50}$  de la hesperidina en el eje de las abscisas con el valor de la  $DE_{50}$  del fármaco depresor del SNC combinado en el eje de las ordenadas para obtener la línea de aditividad (Tallarida, 2000). La cantidad de cada componente en la combinación [dosis experimental ( $Z_{exp}$ ) y dosis aditiva teórica ( $Z_{ad}$ )] se representaron en la misma gráfica. Los valores de las dosis aditivas teóricas caen sobre la línea que conecta los valores de las  $DE_{50}$  de los fármacos individuales. Los valores de las dosis experimentales que cayeron abajo y a la izquierda de la línea de aditividad y fuera de la zona de aditividad se consideraron para indicar un efecto sinergista o superaditivo, en tanto que los valores de las dosis experimentales que cayeron arriba y a la derecha de la línea de aditividad, y de igual forma fuera de la zona de aditividad indicaron una interacción atenuante o subaditiva.

## VII. RESULTADOS.

Se realizaron las curvas dosis-respuesta (Figura 11) de la interacción sedante entre los fármacos depresores del SNC: buspirona, diacepam, difenhidramina, etanol, haloperidol y pentobarbital, y la hesperidina, en ratones machos ICR, con las dosis totales mencionadas y fijadas en el Cuadro 3 a las proporciones fijas 1:1, 1:3 y 3:1. Estas curvas se utilizaron posteriormente para determinar la DE<sub>50</sub> en cada interacción que posteriormente se utilizó para el análisis isobolográfico.

De las curvas dosis-respuesta, solamente se trabajó con la parte lineal de la curva, donde  $r^2$  tendía a un valor mayor a 0.8. Para cada curva se determinó la DE50 de cada combinación en sus diferentes proporciones evaluadas.

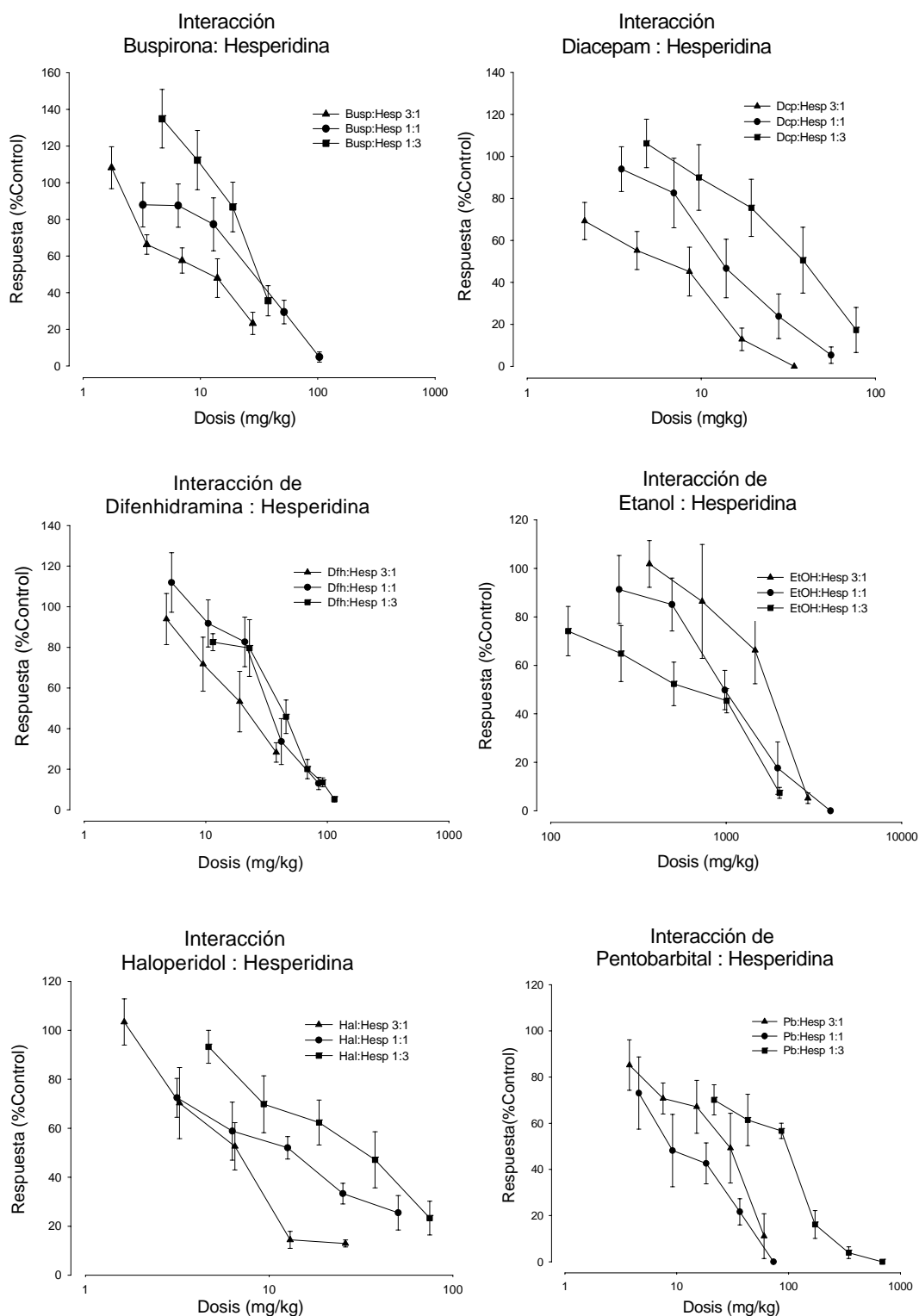


Figura 11. Curvas dosis-respuesta de las combinaciones de fármaco:hesperidina en las tres proporciones evaluadas. En el eje de las Y se muestran los resultados como porcentajes (media±EEM) del correspondiente control para el efecto sedante de bupiriona, diacepam, difenhidramina, etanol, haloperidol y pentobarbital al ser administrados conjuntamente con hesperidina. En el eje de las X está graficado el logaritmo de la dosis en mg/kg.

Cuadro 4. Valores de  $Z_{ad}$  y  $Z_{exp} \pm EEM$  para la administración conjunta de hesperidina y los diferentes fármacos depresores del sistema nervioso central en diferentes proporciones.

Combinación	Proporción	Zad(mg/kg)	Zexp (mg/kg)	Magnitud de la interacción <sup>a</sup>
Buspirona:hesperidina	3:1	6,98 ± 2,62	10,16 ± 1,49	1,46
	1:1	12,92 ± 5,23	25,63 ± 4,13	1,98
	1:3	18,86 ± 7,85	28,48 ± 5,04	1,51
Diacepam:hesperidina	3:1	8,55 ± 2,64	5,08 ± 0,75	0,59
	1:1	13,97 ± 5,24	14,10 ± 2,11	1,01
	1:3	19,38 ± 7,85	33,97 ± 7,25	1,75
Difenhidramina:hesperidina	3:1	18,99 ± 2,66	19,54 ± 4,03	1,03
	1:1	20,93 ± 5,24	32,53 ± 4,52	1,55
	1:3	22,86 ± 7,85	41,27 ± 2,72	1,81
Etanol:hesperidina	3:1	1460,32 ± 94,79	1397,68 ± 214,64	0,96
	1:1	981,81 ± 63,39	873,31 ± 111,31	0,89
	1:3	503,30 ± 32,54	472,96 ± 84,67	0,94
Haloperidol:hesperidina	3:1	6,50 ± 2,61	6,58 ± 0,85	1,01
	1:1	12,60 ± 5,23	11,51 ± 2,18	0,91
	1:3	18,70 ± 7,85	27,99 ± 5,01	1,50
Pentobarbital:hesperidina	3:1	15,09 ± 2,66	18,38 ± 3,36	1,22
	1:1	18,33 ± 5,24	10,83 ± 2,33	0,59
	1:3	21,56 ± 7,85	61,19 ± 9,29	2,84 *

<sup>a</sup>. Calculada de acuerdo a la ecuación  $a / A + b / B$ , ver sección de Análisis estadístico en Materiales y Métodos. \*diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) de 1,  $a/A + b/B$  fue  $> 1.0$  lo que indica interacción subaditiva

La administración simultánea de bupiriona + hesperidina se muestra en la Figura 12. Los círculos representan los puntos teóricos ( $Z_{ad}$ ) y los triángulos representan los puntos experimentales ( $Z_{exp}$ ) los cuales aunque gráficamente se muestran por arriba de la línea de aditividad, estadísticamente no existe diferencia significativa entre la  $Z_{ad}$  y  $Z_{exp}$ , en ninguna de las combinaciones evaluadas, por lo tanto la relación es de tipo aditiva. Los datos obtenidos se muestran en el Cuadro 4.

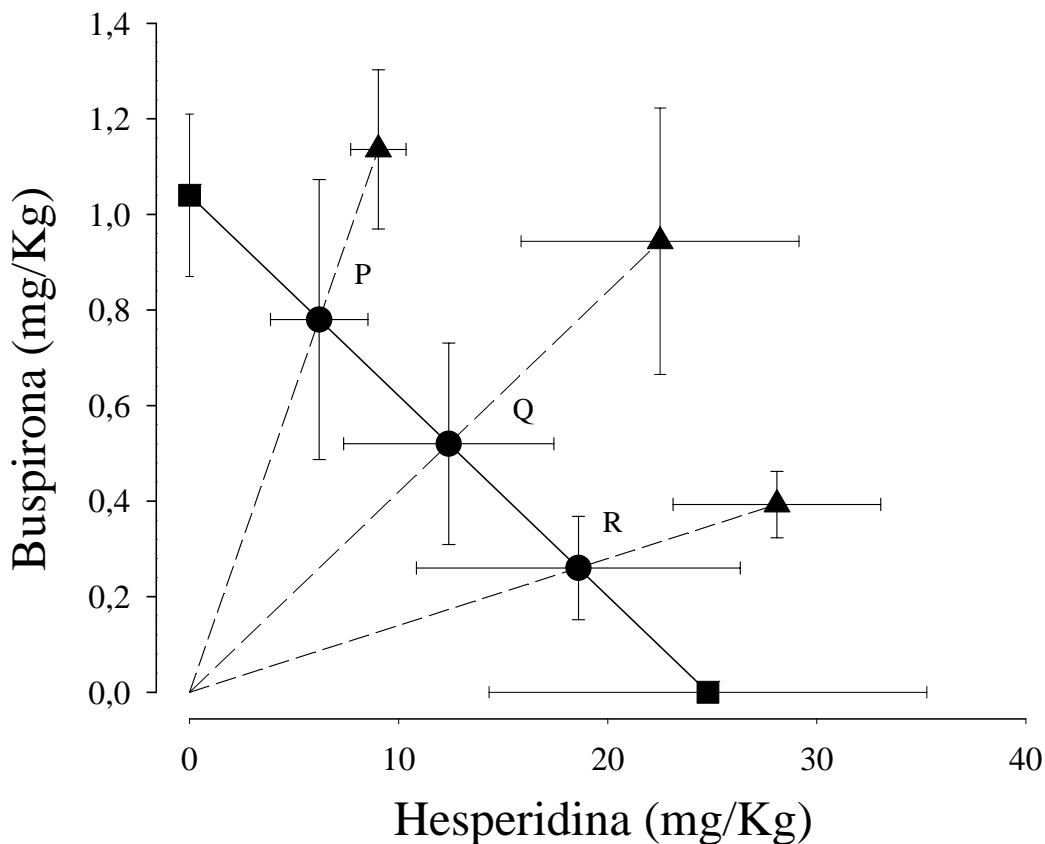


Figura 12. Isobolograma que muestra la interacción entre bupiriona y el flavonoide hesperidina, en ratones machos ICR, en tres diferentes proporciones: P (3:1), Q (1:1) R (1:3). Los círculos representan los puntos teóricos y los triángulos representan los puntos experimentales. La interacción es de tipo aditiva.

El isoblograma de la interacción entre el diacepam y la hesperidina (Figura 13), muestra que en la proporción diacepam:hesperidina 3:1, el punto experimental cae por debajo de la línea de aditividad, lo que haría pensar que existe un efecto superaditivo; en cambio en la proporción diacepam:hesperidina 1:3, el punto experimental presenta una ligera tendencia hacia la subaditividad por presentarse por arriba de la línea de subaditividad, sin embargo, estadísticamente no existe diferencia significativa para ninguno de los dos casos, por lo que la relación entre el diacepam y la hesperidina es de tipo aditiva. Los valores de  $Z_{ad}$  y  $Z_{exp} \pm EEM$  se muestran el Cuadro 4.

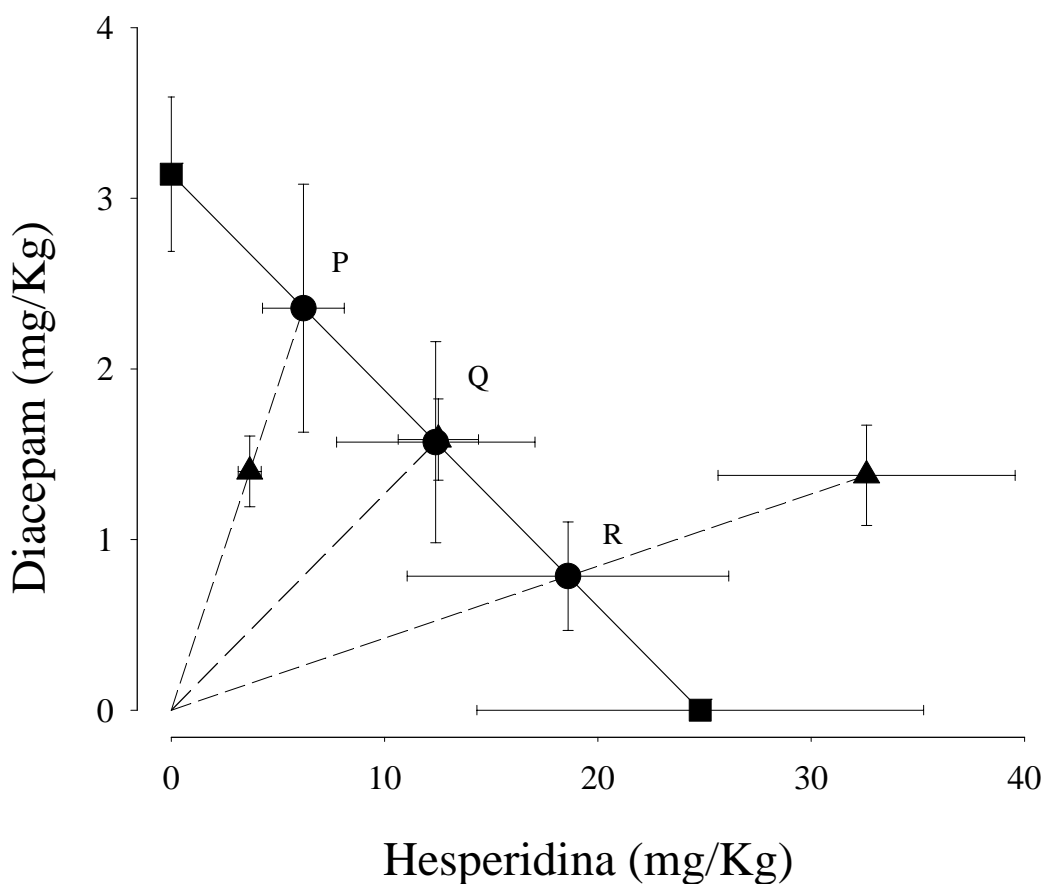


Fig 13. Isoblograma que muestra la interacción entre diacepam y el flavonoide hesperidina, en ratones machos ICR, en tres diferentes proporciones: P (3:1), Q (1:1) R (1:3). Los círculos representan los puntos teóricos y los triángulos representan los puntos experimentales. La interacción es de tipo aditiva.



Cuando se administra conjuntamente etanol + hesperidina, los ejes del isoblograma cambian debido a que el compuesto menos activo en esta ocasión corresponde al etanol ( $DE_{50} = 1938,83 \pm 126.35$ ) (Figura 14), con la gráfica se puede observar que la relación es de tipo aditivo para las tres proporciones estudiadas, y estadísticamente no existe diferencia significativa entre los valores de  $Z_{ad}$  y  $Z_{exp}$ , como se muestra en el Cuadro 4. En la dosis más alta de la proporción etanol:hesperidina 3:1, los animales murieron después de una hora de la administración quizá por intoxicación, ya que presentaban cianosis y dificultad para respirar.

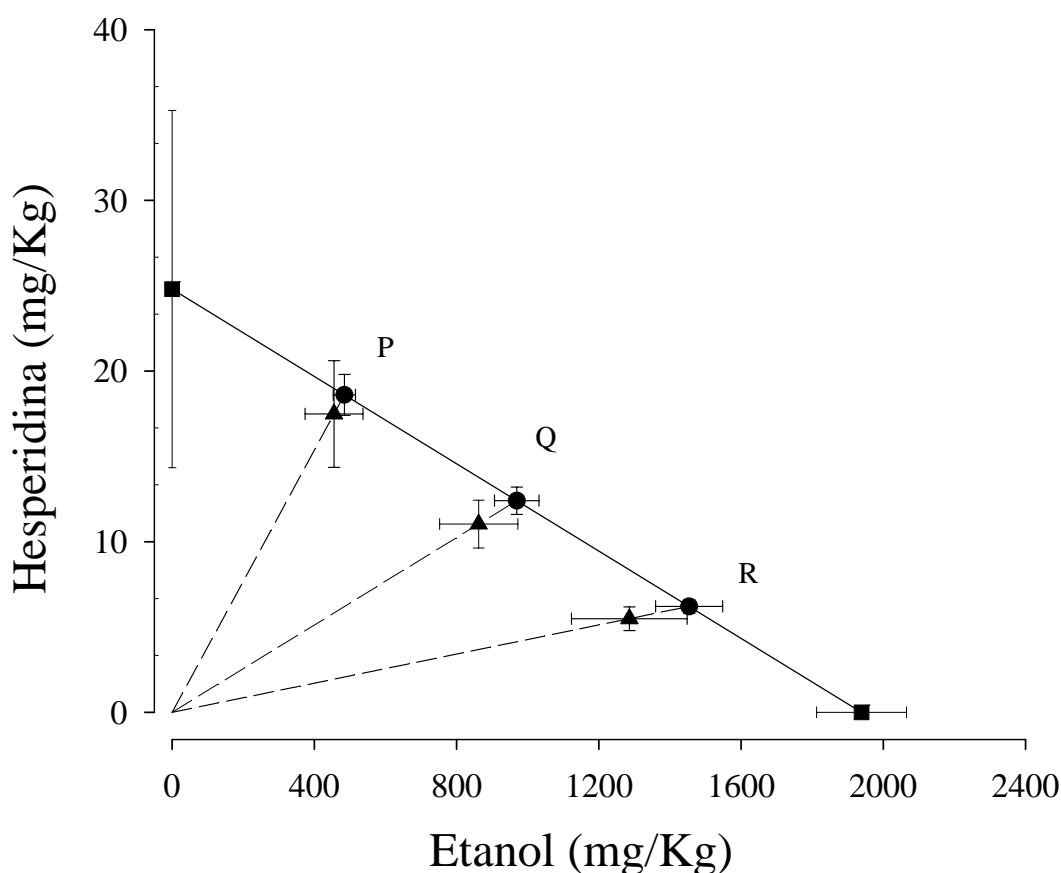


Figura 14. Isoblograma que muestra la interacción entre etanol y el flavonoide hesperidina, en ratones machos ICR, en tres diferentes proporciones: P (3:1), Q (1:1) R (1:3). Los círculos representan los puntos teóricos y los triángulos representan los puntos experimentales. La interacción es de tipo aditiva.

Al administrar haloperidol + hesperidina en la proporción de haloperidol:hesperidina 1:3, se puede ver una ligera tendencia hacia la subaditividad (Figura 15), sin embargo estadísticamente no existe una diferencia significativa entre los valores de  $Z_{ad}$  y  $Z_{exp}$  ( $Z_{ad} = 18.70 \pm 7.85$  y  $Z_{exp} = 27.99 \pm 5.01$ ).

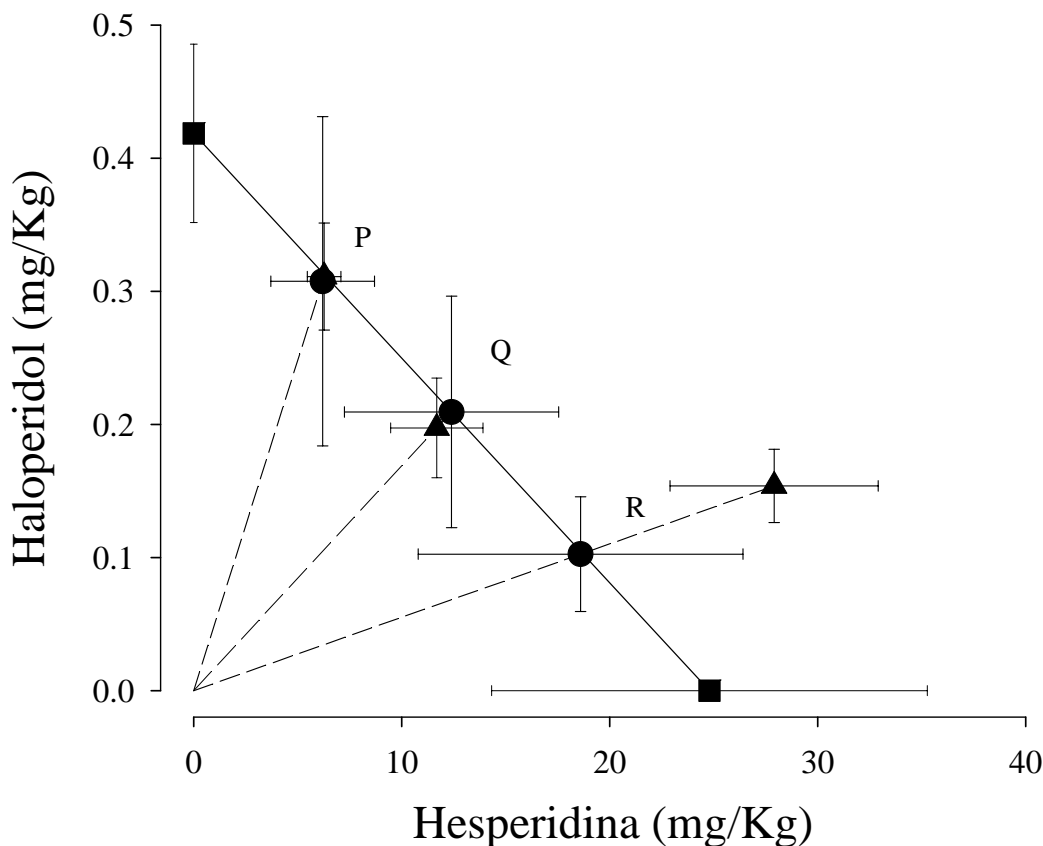


Figura 15. Isoblograma que muestra la interacción entre haloperidol y el flavonoide hesperidina, en ratones machos ICR, en tres diferentes proporciones: P (3:1), Q (1:1) R (1:3). Los círculos representan los puntos teóricos y los triángulos representan los puntos experimentales. La interacción es de tipo aditiva.

El isoblograma para la combinación difenhidramina + hesperidina (Figura 16) también dio como resultado una relación aditiva. Se podría proponer una interacción subaditiva en la proporción de difenhidramina:hesperidina 1:1 y más aun en la proporción 1:3, sin embargo la diferencia entre los valores de  $Z_{ex}$  y de  $Z_{ad}$  no fue estadísticamente significativa. Se puede deber a que dentro de estas 2 combinaciones existió mayor variabilidad en el efecto sedante.

Cuando se administró la difenhidramina a una dosis de 51.18 mg/kg y la hesperidina 24.8 mg/kg dentro de la proporción de difenhidramina:hesperidina 3:1, los animales presentaron movimientos anormales de tipo convulsivo, por lo que esta dosis se descartó para el cálculo de  $DE_{50}$  ya que el efecto que se estaba observando era otro y no el efecto sedante que se estaba evaluando en el cilindro de exploración.

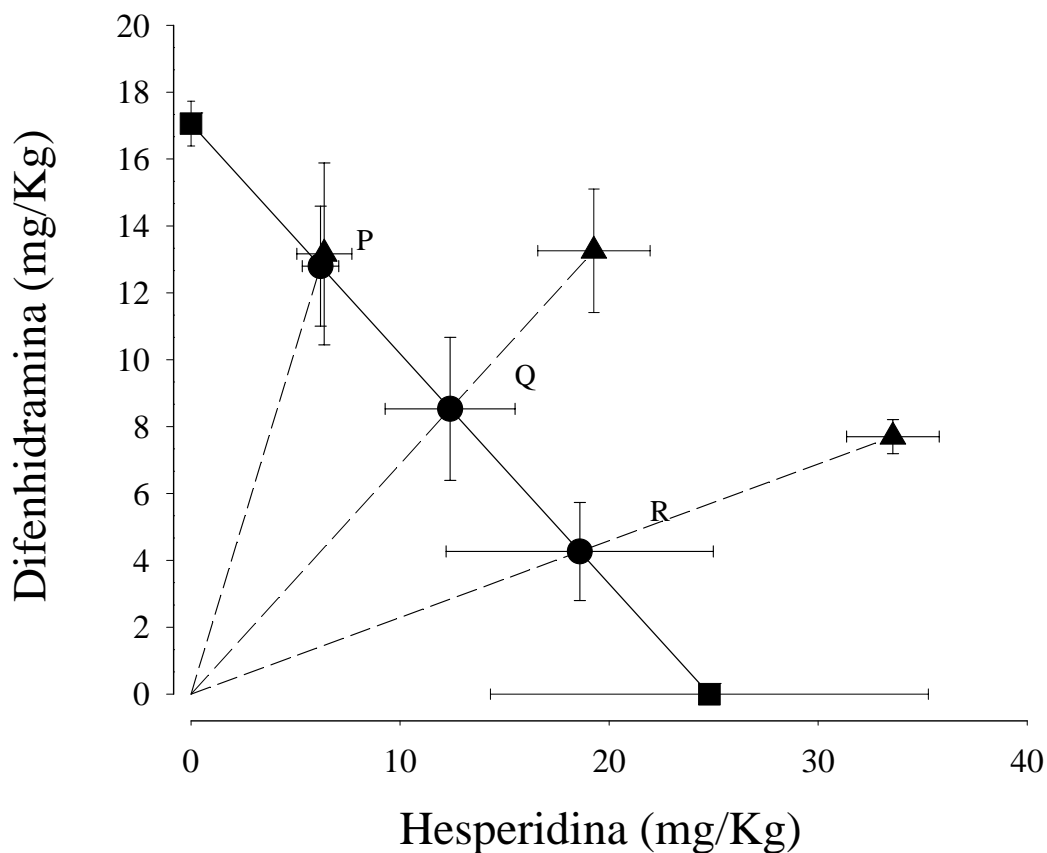


Figura 16. Isoblograma que muestra la interacción entre difenhidramina y el flavonoide hesperidina, en ratones machos ICR, en tres diferentes proporciones: P (3:1), Q (1:1) R (1:3). Los círculos representan los puntos teóricos y los triángulos representan los puntos experimentales. La interacción es de tipo aditiva.

Cuando se co-administró pentobarbital + hesperidina, en la proporción de pentobarbital:hesperidina 3:1 la relación es claramente de tipo aditiva (Figura 17). En la proporción 1:1 se podría proponer una interacción de superaditividad o sinérgica, sin embargo con un 95% de confianza podemos asegurar que no existe diferencia significativa entre los valores de  $Z_{ad}$  y  $Z_{ex}$  (Cuadro 4). Por otro lado cuando la hesperidina se encuentra en mayor proporción en la mezcla (proporción 1:3), el valor de  $Z_{exp}$  es mayor al de  $Z_{ad}$ , por lo que la interacción es subaditiva ( $Z_{ad} = 21.56 \pm 7.85$  y  $Z_{exp} = 61.19 \pm 9.29$ ).

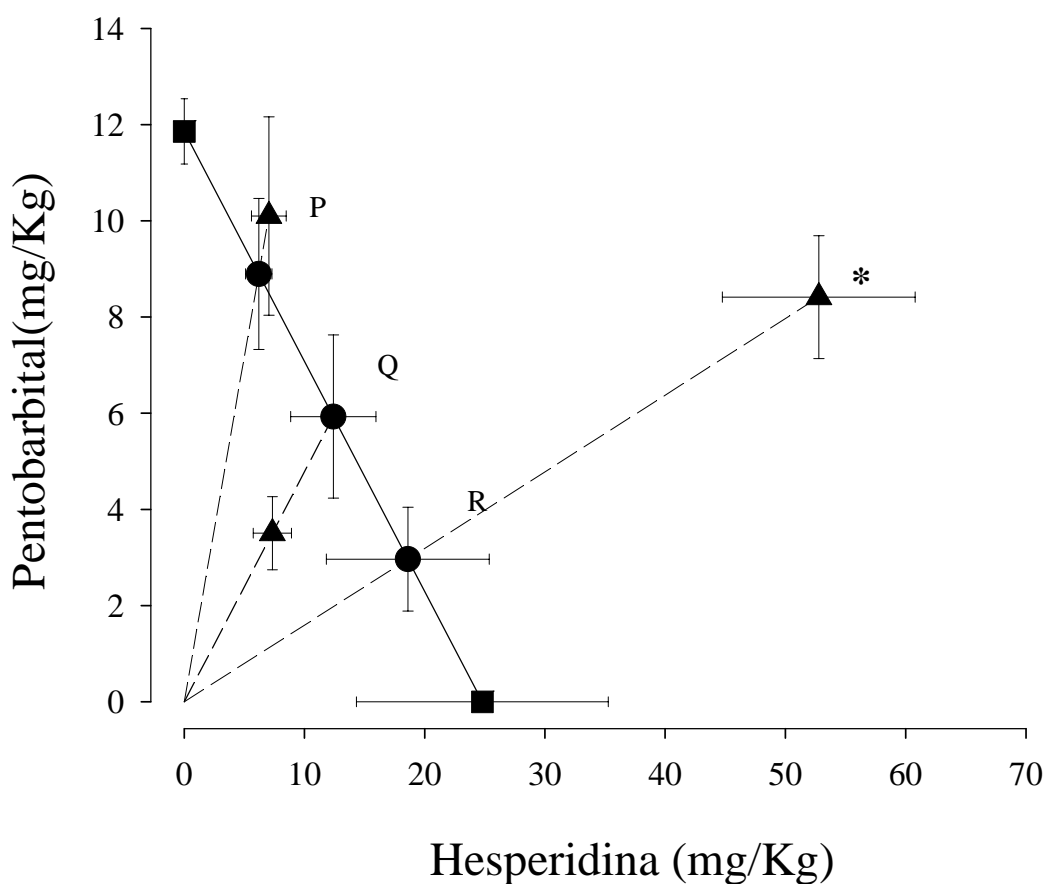


Figura 17. Isobolograma que muestra la interacción entre pentobarbital y el flavonoide hesperidina, en ratones machos ICR, en tres diferentes proporciones: P (3:1), Q (1:1) R (1:3). Los círculos representan los puntos teóricos y los triángulos representan los puntos experimentales. La interacción es de tipo aditiva para las proporciones 3:1 y 1:1, y es de tipo subaditiva para la proporción 1:3 \*  $p < 0.05$  respecto a  $Z_{ad}$ .

## VIII. DISCUSIÓN.

Se ha demostrado que la hesperidina tiene efecto sedante (Marder et al., 2003), sin embargo no existen reportes (con excepción de diacepam) (Fernández et al., 2005), de estudios de interacción entre la hesperidina y otros fármacos depresores del sistema nervioso central.

Los resultados obtenidos por medio del análisis isobolográfico de la interacción entre los fármacos depresores del SNC, buspirona, diacepam, haloperidol y etanol, con el flavonoide hesperidina, es de tipo aditiva, es decir que no existe una interacción entre ellos y que sus efectos son independientes.

Aunque en etanol se demostró una relación de tipo aditiva con el flavonoide hesperidina, cuando se administra una dosis de etanol = 5816.44 mg/kg y hesperidina = 24.8 mg/kg, los animales murieron después de una hora de la administración, lo cual si permitió realizar el estudio en el cilindro de exploración, pero después de observar que los animales morían, se decidió no tomar en cuenta los datos de esta última dosis de la proporción etanol:hesperidina 3:1, pues no se puede asegurar que el efecto observado en el cilindro de exploración sea el efecto sedante o se deba a otro efecto probablemente sea el efecto tóxico del alcohol presente en altas dosis (Gillian, 1985; Kalant y Khanna, 2002; Lieber 1997).

Los efectos convulsivos observados cuando se co-administra la difenhidramina con el flavonoide hesperidina en la dosis más alta de la proporción 3:1, despiertan interés pues la difenhidramina es un fármaco de venta libre, fácil acceso, y comúnmente utilizado por la población como primera opción en los trastornos del sueño, así como para el tratamiento de mareos causados por viajes en vehículos o aviones (Bender et al., 2003; Kadar, 2002). En este sentido se tendría que poner mayor atención sobre los efectos que causa la difenhidramina cuando se administra a dosis altas y cuando se administra en conjunto con la hesperidina, ya que la hesperidina es un flavonoide natural que se encuentra en los cítricos, y forma parte de la dieta habitual de las personas, al ingerirlo por ejemplo en el jugo de frutas cítricas (Gartg et al., 2001).

Se sabe que los antihistamínicos en dosis altas ocasionan estimulación central y pueden producir convulsiones, además de ser depresores cardiacos. Las interacciones de

los antihistamínicos con otras sustancias pueden tener consecuencias graves. Los antihistamínicos más antiguos intensifican los efectos centrales de otros fármacos depresores del SNC, entre ellos el alcohol (Kadar, 2002).

Un grupo de investigadores argentinos (Fernández et al., 2005) reporta la interacción de la hesperidina con diazepam y encuentra con ayuda del análisis isobolográfico que existe una interacción de tipo sinergista o super-aditiva entre ellos, sin embargo en este trabajo se demuestra que a las tres diferentes proporciones evaluadas, no existe tal interacción, por el contrario, la relación que se presenta entre la hesperidina y el diazepam encontrada es solamente de carácter aditivo.

Marder et al., en 2003 probó que la hesperidina no es ligando al sitio de unión a benzodiazepinas, así como tampoco lo es para el receptor  $5HT_{1A}$ ,  $5HT_2$ , receptores AMPA ni para adenosina  $A_1$ . Por lo que, es más lógico pensar que efectivamente no puede existir, al menos directamente, algún tipo de interacción entre el diazepam y la hesperidina, o entre buspirona y hesperidina, tal y como se demuestra en este trabajo. Incluso cuando la proporción de hesperidina se encuentra en mayor proporción que el diazepam (tres veces más de hesperidina), se presenta una ligera tendencia hacia la sub-aditividad o antagonismo como se muestra en la Figura 13, aunque después de realizar el análisis estadístico se demuestra con  $p < 0.05$  que no existe diferencia significativa entre los valores de  $Z_{ad}$  y  $Z_{teo}$  (Cuadro 4). Estos resultados contrastan significativamente con lo reportado por Fernández et al., 2005.

Del análisis isobolográfico realizado, se determinó que sí existe una interacción entre pentobarbital y hesperidina, la cual es de tipo subaditiva pues entre los valores de  $Z_{ad} = 21.56 \pm 7.85$  y  $Z_{exp} = 61.19 \pm 9.29$ , si existe diferencia significativa, la cual también se puede apreciar gráficamente (Figura 17). El flavonoide hesperidina se encuentra presente en *V. officinalis* y *V. wallichii* (Marder et al., 2003), por lo que no se descarta que también se encuentre presente de manera significativa en otras especies de valeriana. Si asumimos éste hecho, la interacción de sub-aditividad encontrada entre el pentobarbital y la hesperidina en este trabajo estaría siendo confirmada también por el trabajo realizado por Ugalde et al., 2005 donde la co-administración del extracto hidroalcohólico de *Valeriana edulis* spp *procera* y el pentobarbital, en una proporción 1:1 se observó una ligera tendencia a la subaditividad, aunque no se puede asegurar esto debido a que en la valeriana existen otros componentes, los cuales pudieran tener por sí

solos este efecto, o tenerlo cuando interactúan con algún otro componente que se encuentre presente en la especie.

Es importante hacer notar que con excepción de etanol, cuando se administra conjuntamente el fármaco en menor proporción que la hesperidina (1:3) dentro de la mezcla, existe una ligera tendencia a la sub-aditividad, aunque estadísticamente no se puede comprobar esta relación.

Los estudios de interacción entre productos naturales y fármacos son escasos (Fugh-Berman y Ernst, 2001), sin embargo es urgente conocer dichas interacciones debido a que se tiene la idea equivocada, muy difundida entre la población general, de que lo natural es sinónimo de inocuo. Pero se encontró en este estudio que a ciertos niveles de dosis con etanol y con difenhidramina se presentan efectos que indican cierto grado de toxicidad.

Por otro lado, el hecho de encontrar efectos aditivos con varios fármacos depresores del SNC, indica la complejidad de la acción de la hesperidina en el SNC, ya que a la fecha no se conoce cual es su mecanismo de acción y de acuerdo al análisis isobolográfico un efecto aditivo indica que los fármacos actúan por mecanismos parecidos (Tallarida, 2000). Que actúen por un mecanismo de acción similar no necesariamente implica que actúe sobre el mismo receptor.

## **IX. CONCLUSIONES.**

En este trabajo se realizó el análisis isobolográfico de la interacción entre los fármacos depresores del sistema nervioso central, buspirona, diacepam, difenhidramina, etanol, haloperidol y pentobarbital y el flavonoide hesperidina, lo que permitió llegar a las siguientes conclusiones:

- El efecto sedante evaluado en ratones ICR, en el modelo de cilindro de exploración y aplicando el análisis isobolográfico muestra que cuando se co-administra el flavonoide hesperidina con la buspirona, difenhidramina, etanol, o haloperidol, la relación es de tipo aditiva, lo cual contrasta con la interacción sinergista que se esperaba obtener con uno o varios de los fármacos estudiados.
- El efecto sedante evaluado en ratones ICR, en el modelo de cilindro de exploración y aplicando el análisis isobolográfico, cuando se co-administra el flavonoide hesperidina y el diacepam, muestra una relación de tipo aditiva. Por lo que, la interacción de tipo sinergista encontrado por Fernández et al., (2005) entre la hesperidina y el diacepam no se corrobora en este trabajo.
- Los resultados obtenidos en este trabajo, y lo anteriormente reportado en la literatura, sugieren que el flavonoide hesperidina tiene una actividad sedante que pudiera no estar relacionada directamente con los receptores sobre los cuales actúan los fármacos evaluados, sino que pudiera tener un mecanismo a otro nivel.



## **X. PERSPECTIVAS.**

Aunque se tiene información sobre la actividad de la hesperidina, se sabe muy poco sobre su acción en el sistema nervioso central, menos aún se conoce o se ha logrado elucidar su mecanismo de acción

Este flavonoide abundante en los cítricos, de bajo costo, y que ahora se ha encontrado en la especie valeriana, tiene grandes perspectivas en el área de sedación pues podría ser una alternativa para tratar el insomnio; además de que si se logra establecer su mecanismo de acción, podría ser un fármaco líder para el desarrollo de nuevos fármacos contra este padecimiento tan común.

Sabiendo que los efectos son aditivos y los estudios realizados hasta ahora sobre el flavonoide hesperidina, indican que esta es segura y no tiene efectos secundarios incluso en el embarazo (Garg et al., 2001), se podría recurrir a que, basados en la relación dosis-respuesta, se sustituya en cierta proporción el fármaco por la hesperidina, tal que se tenga el mismo efecto, y se reduzcan los efectos adversos indeseables de dichos fármacos.

## XI. BIBLIOGRAFÍA.

- Baldessarini R. J., Tarazi F.I. (2006). Fármacos utilizados en el tratamiento de desórdenes psiquiátricos. En L. L. Brunton., J.S. Lazo., K.L Parker (Eds). *Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 11a edición. Mc Graw Hill, Colombia. 485-520.
- Benca R. (2005). Diagnosis and treatment of chronic insomnia: a review. *Psychiatric services*. **56**, 332-343.
- Bender, B., Berning, S., Duden, R., Milgrom, H., Vu-Tran, Z. (2003). Sedation and performance impairment of diphenhydramine and second-generation antihistamines: A meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **11**, 770-776.
- Barrera-Salgado L.A. (2003). Trabajo monográfico de actualización. Estudio recapitulativo de fármacos ansiolíticos. *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Química. UNAM.
- Camí J., Ayesta F.J. (1999). Farmacodependencias. En Flórez J., Armijo J. A., Mediavilla A. (Eds). *Farmacología humana.*, tercera edición., Masson S.A. 565-591.
- Carlini E.A. (2003). Plants and the central nervous system. *Pharmacology biochemistry and behavior*. **75**, 501-512.
- Charney, D.S., Mihic, S.J., Harris R.A. (2006). Hipnóticos y Sedantes. En L. L. Brunton., J.S. Lazo., K.L Parker (Eds)., *Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.*, 11a edición., Mc Graw Hill, Colombia. 401-427.
- Dewick P. (1997). *Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach*. Jonh Wiley & sons. Inglaterra.135-137.

- Di Carlo, G., Mascolo N., Izzo A., Capasso F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs (minireview). *Life Sciences*. **65**, 337-353.
- Deng W., Fang X., Wu J. (1997). Flavonoids function as antioxidants: By scavenging reactive oxygen species or by chelating iron?. *Radiation Physics and Chemistry*. **50**, 271-276.
- Domínguez X. A. (1979). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Editorial Limusa, México, pp 81-89.
- Eison, A., Temple, D. (1986). Buspirone: Review of its Pharmacology and current perspectives on its mechanism of action. *The American Journal of Medicine*. **80**, 1-9.
- Fernández, S., Wasowski, C., Loscalzo L., Granger R., Johnston G., Paladini A., Marder M. (2006). Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *European Journal of Pharmacology*. **539**, 168-176.
- Fernández, S., Wasowski C., Paladini A., Marder M. (2005). Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam. *European Journal of Pharmacology*. **512**, 189-198.
- Fernández S., Wasowski, C., Paladini C., Marder M. (2004). Sedative and sleep-enhancing properties of linarin. *Pharmacology biochemistry and behavior*. **77**, 399-404.
- Flórez J. (1999). Fármacos antipsicóticos neurolepticos. En Flórez J., Armijo J. A., Mediavilla A. (Eds). *Farmacología humana*, tercera edición., Masson S.A. 533-547.
- Fugh-Berman, A., Ernst, E. (2001). Herb-drug interactions: Review and assessment of reliability. *British Journal of Clinical Pharmacology*. **52**, 587-595.
- Garg A., Garg S. (2001). Chemistry and Pharmacology of The Citrus Bioflavonoid Hesperidin. *Phytotherapy research*. **15**, 655-669.

- Gillian D., Philips T., Dudek B. (1985). A comparison of ethanol absorption and narcosis in long- and short-sleep mice following intraperitoneal or intragastric ethanol administration. *Alcohol*. **2**, 655-658.
- Gobert A., Rivet J.M., Cistarelli L., Melon C., Millan M.J. (1999). Buspirone modulates basal and fluoxetine-stimulated dialysate levels of dopamine, noradrenaline and serotonin in the frontal cortex of freely moving rats: activation of serotonin<sub>1A</sub> receptors and blockade of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors underline its actions. *Neuroscience*. **93**, 1251-1262
- Harvey A. G. (2001). Insomnia: symptom or diagnosis?. *Clinical Psychology review*. **21**, 1037-1059.
- Hurlé M. A. (1999). Fármacos ansiolíticos y sedantes. En Flórez J., Armijo J. A., Mediavilla A. (Eds). *Farmacología humana.*, tercera edición., Masson S.A. 453-467.
- Ito T., Suzuki T., Wellman S. E., Kang Ho I. (1999). Pharmacology of barbiturate tolerance/dependence: GABA<sub>A</sub> receptors and molecular aspects. *Life Sciences*. **59**, 169-195.
- Julsing M. K., Koulman A., Woerdenbag H. J., Quax W. J., Kayser O. (2006). Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. *Biomolecular Engineering*. **23**. 265-279.
- Kadar D. (2002). Histamina y antihistamínicos. En Kalant H., Roschlau W. (Eds). *Principios de Farmacología Médica.*, sexta edición., Oxford University Press., México. 403-412.

- Kalant H., y Khanna J.M. (2002). Alcoholes. En Kalant H., Walter H., Roschlau W. (Eds). *Principios de Farmacología Médica.*, sexta edición., Oxford University Press., México.pp 303-316.
- Lee, SH., Jeon, TS., Park, YB., Kwon, YK., Choi, MS., Bok, SH. (1999). Hypocholesterolemic effect of hesperetin mediated by inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and acyl coenzyme A: Cholesterol acyltransferase in rats fed high-cholesterol diet. *Nutrition Research.*, **19**, 1245-1258.
- Lieber C. (1997). Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clinica Acta.* **257**, 59-84.
- Liu Y, Deitrich R. (1998). Role of GABA in the actions of ethanol in rats selectively bred for ethanol sensitivity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* **60**, 793-801.
- López L, T. (2006). Insomnio. Abordaje fitoterapéutico. *Fitoterapia.* **25**,60-63.
- Marder, M., Viola H., Wasowski C., Fernández S., Medina J., Paladini A. (2003). 6-Methylapigenin and hesperidin: new valerian flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* **75**, 537-545.
- McKernan R. M., Roahl T.W., Reynolds D. S., Sur C., Wafford K. A., Atack J. R., Farrar S., Myers J., Cook G., Ferris P., Garret L., Bristow L., Msrshall G., Macaulay A., Brown N., Howell O., Moore K.W., Carling R. W., Street J., Castro L., Ragan C. I., Dawson G. R., Whiting P. J. (2000). Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha_1$  subtype. *Nature Neuroscience.* **3**, 587-592.
- Morris, M., Zhang A. (2006). Flavonoid-drug interactions: Effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sciences.* **78**, 2116-2130.

- Paladini. A., Marder M., Viola H., Wolfman C., Wasowski C., Medina J. (1999). Flavonoids and the Central Nervous System: from Forgotten Factors to Potent Anxiolytic Compounds. *J. Pharm. Pharmacol.* **51**, 519-526.
- Panthong A., Supraditaporn W., Kanjanapothi D., Taesotikul T., Reutrakul V. (2006). Analgesic, anti-inflammatory and venotonic effects of *Cissus quadrangularis* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*. In Press, Corrected Proof.
- Pazos A. (1999). Mediadores celulares I. Histamina y 5-hidroxitriptamina. Farmacología de la migraña. En Flórez J., Armijo J. A., Mediavilla A. (Eds). *Farmacología humana.*, tercera edición., Masson S.A. 305-325.
- Pleuvry B.J. (2004). Anxiolytics and hypnotics. *Anaesthesia and intensive care medicine.* **5**, 252-256.
- Sander-Bush, E., Mayer S. E. (2006). Agonistas y antagonistas de los receptores de 5-hidroxitriptamina (serotonina). En L. L. Brunton., J.S. Lazo., K.L Parker (Eds). *Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.* 11a edición. Mc Graw Hill, Colombia. 297-315.
- Sellers E M., Khanna J. M., y Romach M.K. (2002). Ansiolíticos e hipnóticos. En Kalant H., Walter H., Roschlau W. (Eds). *Principios de Farmacología Médica.* sexta edición., Oxford University Press. México. pp 317-331
- Tallarida, R. (2000). *Drug synergism and dose effect data analysis.* Chapman & Hall/ CRC, USA.
- Tallarida R., Kimmel H., Holtzman S. (1997a). Theory and statistics of detecting synergism between two active drugs: cocaine and buprenorphine. *Psychopharmacology.* **133**, 378-382.
- Tallarida R., Stone D., Raffa R. (1997b). Efficient designs for studying synergistic drug combinations. *Life Sciences,* **61**, PL 417-425.

- Tallarida R. (1992). Statistical analysis of drug combinations for synergism. *Pain*. **49**, 93-97.
- Ugalde, M., Reza, V., González ME., Avula B., Khan I., Navarrete A. (2005). Isobolographic analysis of the sedative interaction between six central nervous system depressant drugs and *Valeriana edulis* hydroalcoholic extract in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **57**, 631-639.
- Wasowski, C., Marder M., Viola H., Medina J., Paladini A. (2002). Isolation and identification of 6-Methylapigenin, a Competitive ligand for the brain GABA<sub>A</sub> receptors, from *Valeriana wallichii*. *Planta Medica*, **68**, 932-934.
- Weatley D. (2005). Medicinal plants for insomnia: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *Journal of Pharmacology*. **19**, 414-421.