
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TITULO DEL TEMA DE TESIS

PERFIL FARMACOLÓGICO DE UN EXTRACTO ACUOSO Y ESTUDIO
FITOQUÍMICO DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE TORONJIL DE MONTE (*Satureja
mexicana* Benth. Briq.)

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

Alejandro Gallegos Solis

MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



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. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez
Vocal	Prof. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Secretario	Prof. Rosa Estrada Reyes
1er. Suplente	Prof. Alejandro Ortiz Osorio
2do. Suplente	Prof. José Fausto Rivero Cruz

El tema se desarrollo en el Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”

Asesora M. en C. Rosa Estrada Reyes

Sustentante. Alejandro Gallegos Solis

ÍNDICE

Agradecimientos

Índice de espectros

Abreviaturas

Figuras y tablas

	<u>Pág</u>
1. Introducción.	1
2. Antecedentes.	3
3. Hipótesis.	20
4. Parte experimental.	21
4.1 Colecta e identificación de la planta.	21
4.2 Obtención del extracto acuoso.	21
4.3 Evaluación farmacológica	22
4.3.1 Diagrama de trabajo de la evaluación farmacológica.	22
4.3.2 Animales y fármacos.	22
4.3.3 Efectos tóxicos generales.	23
4.3.4 Modelo luz-oscuridad “Black & White” para la evaluación de la actividad ansiolítica.	24
4.3.5 Modelo campo abierto para la evaluación de la actividad Locomotriz.	25
4.3.6 Modelos de inducción química de convulsiones para la evaluación de la actividad anticonvulsiva.	25
4.3.7 Modelo platina caliente para la evaluación de la actividad antinociceptiva.	25

4.3.8	Modelo de tablero con perforaciones “Hole-Board” para la evaluación de la actividad sedante.	26
4.3.9	Estadística.	27
4.4	Estudio fitoquímico.	27
4.4.1	Diagrama de trabajo del estudio fitoquímico	28
5.	Discusión de resultados.	36
6.	Conclusiones.	54
7.	Espectros.	55
8.	Referencias.	70

ÍNDICE DE ESPECTROS

	<u>Págs.</u>
Espectro 1. EM por IE de 8-hidroxisalvigenina.	55
Espectro 2. RMN de ^1H de 8-hidroxisalvigenina.	56
Espectro 3. RMN de ^{13}C de 8-hidroxisalvigenina.	57
Espectro 4. EM por IE de 5-desmetoxinobiletina.	58
Espectro 5. RMN de ^1H de 5-desmetoxinobiletina.	59
Espectro 6. RMN de ^{13}C de 5-desmetoxinobiletina.	60
Espectro 7. EM por IE de neoponcirina.	61
Espectro 8. RMN de ^1H de neoponcirina.	62
Espectro 9. COSY de neoponcirina.	63
Espectro 10. HETCOR de neoponcirina.	64
Espectro 11. RMN de ^{13}C de neoponcirina.	65
Espectro 12. EM por IE de hesperidina.	66
Espectro 13. RMN de ^1H de hesperidina.	67
Espectro 14. RMN de ^{13}C de hesperidina.	68
Espectro 15. RMN de ^{13}C de hesperidina.	69

FIGURAS Y TABLAS

	<u>Págs.</u>
Figura 1. Distribución esquemática de regiones cerebrales que participan en la ansiedad.	4
Figura 2. Estructura química de benzodiazepinas	5
Figura 3. Estructura química de algunos fármacos antiepilépticos	9
Figura 4. Taxonomía del toronjil de monte.	14
Figura 5. Toronjil de monte.	15
Figura 6. Flavonoide.	16
Figura 7. Estructura química de flavonoides.	16
Figura 8. Ruta biogenética de flavonoides.	17
Figura 9. Ejemplo: funciones biológicas de los flavonoides.	18
Figura 10. Naringenina.	19
Figura 11. Hesperidina.	19
Figura 12. Diagrama de trabajo de la evaluación farmacológica.	22
Figura 13. Diagrama de trabajo del estudio fitoquímico.	28
Figura 14 y 15. Evaluación del efecto analgésico en el modelo de platina caliente.	37, 38
Figura 16. Evaluación del efecto ansiolítico en el modelo de luz-oscuridad.	39
Figura 17. Evaluación de la actividad locomotriz en el modelo campo abierto.	40
Figura 18 y 19. Evaluación del efecto ansiolítico y/o sedante en el modelo de Hole-Board.	41, 42

Figura 20 y 21. Evaluación del efecto anticonvulsivo en el modelo de inducción de convulsiones por PTZ 90 mg/kg	43, 44
Figura 22 . Patrón de Fragmentación de 5-desmetoxinobiletina.	49
Tabla 1. Neurotransmisores implicados en la ansiedad	4
Tabla 2. Dosis del extracto acuoso de toronjil de monte probadas por experimento	23
Tabla 3. Datos de RMN ^{13}C para los flavonoides aislados	34
Tabla 4. Datos de RMN ^1H para los flavonoides aislados	35

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
cc	Cromatografía en columna
ccf	Cromatografía en capa fina
ccv	Cromatografía en columna al vacío
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
COSY	Espectroscopia de Correlación Homonuclear
dd	doble de doble
dt	doble de triple
DMSO	Dimetilsulfóxido
DZ	Diazepam
D ₂ O	Agua deuterada
EATM	Extracto acuoso de toronjil de monte
EM	Espectrometría de masas
GABA	ácido gama amino butírico
Glu	Glucosa
HETCOR	Espectro de Correlación Heteronuclear
IE	Impacto electrónico
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LD ₅₀	Dosis Letal media
MeOH	Metanol
NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato

OMS	Organización Mundial de la Salud
pf	Punto de fusión
ppm	partes por millón
PTZ	Pentilentetrazol
Rha	Ramnosa
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de ¹³ C
s	singulete
SNC	Sistema Nervioso Central
TMS	Tetrametilsilano
TM	Dominios transmembranales
δ	Desplazamiento químico
5-HT	Serotonina

AGRADECIMIENTOS

Al Sr. Rubén Luviano Jaramillo por su asistencia técnica en la cría y manejo de los animales del Bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz".

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez, del Instituto de Química, UNAM, por las facilidades brindadas para la adquisición de los espectros.

1. INTRODUCCIÓN

El acelerado ritmo de vida de las grandes ciudades, ha generado un incremento en padecimientos como la ansiedad, el insomnio y la depresión; trastornos que ponen en riesgo la salud mental y física de los individuos, y que de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) se han convertido en problemas de salud pública de importancia mundial.

Para paliar estos padecimientos se han sintetizados una variedad de fármacos ansiolíticos y sedantes, sin embargo, aun presentan efectos colaterales y en ocasiones los costos de éstos medicamentos son inaccesibles para algunos sectores de la población.

Por otro lado, el uso de plantas con propiedades terapéuticas es una actividad humana que se remonta a través de los tiempos. A este respecto, México cuenta con una gran tradición milenaria en el uso de plantas medicinales desde tiempos prehispánicos; en el Códice de la Cruz-Badiano (*Libellus de medicinalibus indorum herbis*) se rescata el uso de una gran variedad de plantas medicinales empleadas para tratamiento de diversas enfermedades.

En la actualidad, una gran parte de la población mexicana emplea plantas medicinales como una alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades, entre las que se cuentan aquellas que afectan al Sistema Nervioso Central (SNC).

En la actualidad han sido identificadas en México más de 5000 especies mexicanas con aplicaciones curativas.¹ Su uso medicinal, la abundancia y la diversidad de especies las hacen una fuente potencial para la obtención de sustancias bioactivas.

Algunas de las especies empleadas en la medicina tradicional mexicana por sus efectos sobre el (SNC) son: las pasifloras (*Pasiflora spp.*), la hierba de la pastora (*Salvia divinorum*), los toloaches (*Datura spp.*) y los toronjiles, estos últimos empleados para el tratamiento de los “nervios”, “el susto” y por sus propiedades sedantes. En México, se

conoce como “toronjil” a diferentes plantas medicinales que a pesar de pertenecer a diferentes géneros; en la medicina tradicional son empleadas para los mismos fines. Por ejemplo, *Agastache* spp., *Mellisa officinalis*, *Dracocephalum moldavica* y *Satureja* spp. Uno de éstos “toronjiles” es *Satureja mexicana* (Benth.) Briq. empleado en nuestro país por sus propiedades tranquilizantes, analgésicas y para el tratamiento de los “nervios”. Esta especie recibe diferentes nombres dependiendo de la región; “toronjil de monte” en el estado de Guerrero, “hierba del borracho” en Oaxaca, y “toronjil de menta” en el D.F.

Sin embargo, a pesar de que el “toronjil de monte” (*Satureja mexicana*) es empleado en la medicina tradicional mexicana, existe escasa información sobre su composición química, y no hay informes sobre las propiedades atribuidas a esta especie

De acuerdo a lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo realizar un estudio de los efectos biológicos; principalmente ansiolítico, anticonvulsivo, sedante, y analgésico de un extracto acuoso de *Satureja mexicana* (Benth.) Briq, así como realizar el estudio fitoquímico de los extractos orgánicos de esta especie.

2. ANTECEDENTES

Hoy en día, debido al ritmo de vida que se impone en las sociedades modernas, son cada vez más frecuentes los trastornos como la ansiedad, la depresión, la epilepsia, entre otros. Estos trastornos se consideran un problema de salud pública que afecta a un gran número de la población mundial, de tal forma que estos trastornos, han sido definidos por numerosos expertos en salud mental como una auténtica epidemia silenciosa del siglo XXI²

ANSIEDAD

Los trastornos de ansiedad son considerados como los padecimientos mentales más prevalentes en la actualidad afectando del 5 al 10 % de la población general.³ La ansiedad es una emoción que todos hemos sentido alguna vez, ante una situación desconocida que representa un riesgo potencial a nuestra integridad, de esta forma, resulta ser benéfica para el individuo al permitirle un mayor estado de alerta e impulsarlo a realizar acciones que en circunstancias normales no haría. De esta forma, la ansiedad se puede definir, como una respuesta adaptativa de un organismo ante un estímulo adverso o desfavorable.⁴ Sin embargo, se considera patológica cuando no existe una causa aparente que la provoque y su intensidad es tan alta que interfiere negativamente con el rendimiento y el funcionamiento físico, psíquico y social.²

Los trastornos de ansiedad más comunes, y en ocasiones incapacitantes, se clasifican como: trastorno de la ansiedad generalizada, crisis de angustia o de pánico, desorden obsesivo compulsivo, fobia social, fobia específica, agorafobia, y trastorno por estrés post-traumático. Además, la ansiedad es un componente importante de muchos otros desórdenes psiquiátricos.

Aunque no existe una región única encargada para la integración de la ansiedad, se han identificado varias regiones del cerebro que están implicadas (Figura 1), las cuales

corresponden al sistema límbico, entre éstas destacan estructuras de la corteza cerebral, el septo lateral, la amígdala, el hipocampo y algunas regiones del hipotálamo.⁴

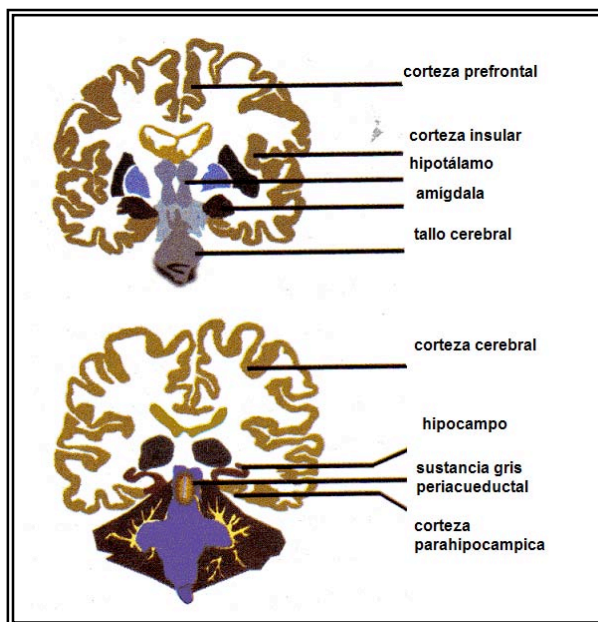


Figura 1. Distribución esquemática de algunas estructuras cerebrales que participan en la ansiedad.⁵

En cuanto a los mecanismos biológicos que subyacen a los trastornos de ansiedad, no parece existir un sistema único de neurotransmisión encargado de generar o modular la ansiedad, algunos de los neurotransmisores involucrados en los procesos de ansiedad se muestran en la Tabla 1. Sin embargo, el sistema gabaérgico es, tal vez, uno de los más importantes ya que aproximadamente el 40 % de los procesos sinápticos son gabaérgicos.

Neurotransmisor	Acción sobre la ansiedad
GABA	Ansiolítica
Ácido glutámico	Ansiogénica
Colecistoquinina	Ansiogénica
Noradrenalina	Ansiogénica
Serotonina	Ansiogénica
Encefalina	Ansiolítica
Dopamina	Ansiolítica
Acetilcolina	Ansiolítica

Tabla 1. Neurotransmisores implicados en la ansiedad

En cuanto a la terapéutica de los trastornos de ansiedad, existen tratamientos efectivos como la farmacoterapia o la terapia cognitiva-conductual, siendo los fármacos del grupo las benzodiazepinas, los más empleados en la clínica. Sin embargo, actualmente aún presentan algunos efectos colaterales, como la pérdida de la memoria retrograda, la disfunción sexual, problemas de sobre peso y la adicción, entre otros.⁶

Estos fármacos actúan, provocando una modificación alostérica en sitios específicos de los receptores GABA_A, favoreciendo la afinidad entre GABA y el receptor, lo cual permite la apertura del canal de cloro, que hiperpolariza la neurona e inhibe la trasmisión de impulsos nerviosos.

Algunas de las benzodiazepinas empleadas actualmente son: el cordiazepóxido, el diazepam, el oxazepam, el clorazepato, el lorazepam, el prazepam, el alprazolam y el halazepam. La Figura 2 ejemplifica la estructura química de las benzodiazepinas.

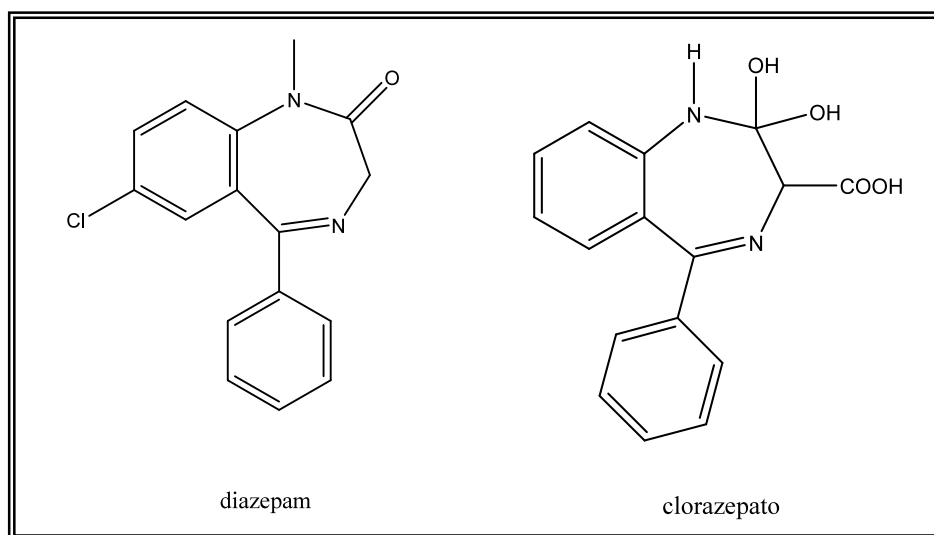


Figura 2. Ejemplo de algunas benzodiazepinas.

Por otro lado, se ha estimado que el 43 % de los pacientes que sufren trastornos de ansiedad recurren a alguna terapia complementaria, la más popular es la medicina

herbolaria. Algunas de las plantas usadas para el tratamiento de la ansiedad son: *Scutellaria lateriflora*, *Centella asiática*, *Paullinia Cupana*, *Piper methysticum*, *Bacopa monniera*, *Cymbopogon citratus*, *Pasiflora incarnata*, y *Valeriana officinalis*.⁵

En el humano con el empleo de cuestionarios podemos conocer si el individuo ha padecido ansiedad y el grado de ésta en alguna etapa de su vida, así bien podemos cuantificar los cambios provocados por este trastorno a nivel periférico como cambios en la presión arterial, la frecuencia cardíaca o respiratoria, o mediante técnicas como la resonancia magnética funcional, o la tomografía por emisión de positrones, las cuales nos permiten identificar las regiones del cerebro involucradas en condiciones experimentales que provocan este trastorno, sin embargo por razones éticas es necesario acudir a la experimentación en animales, para simular en ellos los síntomas de este trastorno que nos permita caracterizar, y conocer las bases biológicas que subyacen a este trastorno. A este respecto, los modelos que se han desarrollado nos permiten someter al animal a determinadas manipulaciones experimentales y evaluar el grado de miedo producido, como una aproximación de la ansiedad en humanos, validando el uso de los modelos animales con fármacos ansiogénicos o ansiolíticos.⁴

EPILEPSIA

La epilepsia se define como una enfermedad en la cual hay un trastorno de la función cerebral que se caracteriza por el surgimiento periódico e impredecible de convulsiones. De acuerdo a la OMS, la epilepsia es la presentación crónica y recurrente de fenómenos paroxísticos por descargas eléctricas anormales en el cerebro (crisis epilépticas), que tienen manifestaciones clínicas variadas y causas muy diversas. De acuerdo a John Hughlings Jackson, una crisis convulsiva se refiere a un trastorno transitorio de la conducta,

causado por la activación desordenada, sincrónica y rítmica de poblaciones enteras de neuronas.⁶

La epilepsia es una enfermedad de la cual hay registros desde la antigüedad, conocida en diversas culturas bajo diferentes nombres y asociada a diversas causas, frecuentemente relacionada con la divinidad, pero siempre como común denominador la presencia de crisis, en ocasiones referidas como crisis tónico-clónico generalizadas, analepsia, apoplejía, mal de la caída, enfermedad de Hércules, mal caduco, mal de la Tierra, mal del infante, mal divino, mal de San Juan, enfermedad demoníaca de Lutero, enfermedad Lunar, mal de San Valentín, entre otros.

La epilepsia en América Latina fue asociada con la magia y la religión tanto por los aztecas como por los Incas. En el México antiguo se refería a la epilepsia como *huapahualtitzli* (enfermedad que encoge los nervios), *huiuxcayotl* (temblor del enfermo), o *nacayomimiquiztli* (enfermedad que mata a la carne). Se han descrito en la herbolaria indígena mexicana varias plantas medicinales usadas para el tratamiento de la epilepsia o convulsiones entre las que se encuentran el *acaxochitl* (*Loberia laxiflora*), el *metl* (*Atrovirens amary*), *ecapatli* (*Cassia occidentales*), *tepopotic* (*Bacharis conferta*), *iczotl* (*Yuca australis*), *tepecuitlazotl* (*Chenopodium ambrosoides*) y el *tlatlancauye* (*Iresine calez*), entre otros.⁷

Una manera de clasificar la epilepsia es de acuerdo al tipo de crisis que se presente en: crisis generalizadas (involucra a todo el organismo) o parciales (se restringe a un grupo muscular), a su vez en simples (sin pérdida de la conciencia) o complejas (pérdida de la conciencia), también dependiendo en el tipo de movimiento convulsivo de las crisis, éstas se pueden clasificar en tónicas (contracciones sostenidas), clónicas (movimientos repetitivos) y mioclonias (movimientos de músculos aislados).

El tratamiento de la epilepsia es sintomático, los fármacos disponibles inhiben las convulsiones, sin curar la enfermedad y los tratamientos son a largo plazo con efectos adversos.

Los mecanismos de acción de los fármacos anticonvulsivos entran en tres categorías:

- fármacos que limitan la activación repetitiva y sostenida de las neuronas (efecto mediado por la promoción del estado inactivado de los canales de Na^+ dependientes de voltaje);
- fármacos que incrementan la inhibición sináptica mediada por GABA;
- y fármacos que limitan la activación de canales de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T.

La etiología de este trastorno es diversa. Un daño severo al cerebro puede conducir a la generación de epilepsia, entre los daños más frecuentes encontramos: trauma cerebral, hemorragia, infecciones (meningitis, encefalitis o abscesos), malformaciones vasculares y tumores benignos o malignos, así como por factores de origen genético o metabólico.

Actualmente, existe una variedad de fármacos para el tratamiento de la epilepsia, fármacos como la fenilhidantoína, la cual es eficaz contra todos los tipos de crisis parciales y tónico-clónicas, pero no contra las crisis de ausencia, los barbitúricos como el fenobarbital y el mefobarbital, eficaces en el tratamiento de convulsiones tónico-clónicas generalizadas, mientras que los dexosibarbitúricos como la primidona son eficaces para el tratamiento de convulsiones parciales y tónico-clónicas, y el ácido valproíco, y las benzodiazepinas como el clonazepam y clorazepato son empleadas en el tratamiento de cualquier tipo de crisis.⁸ En la Figura 3 se ejemplifica la estructura química de algunos fármacos antiepilépticos.

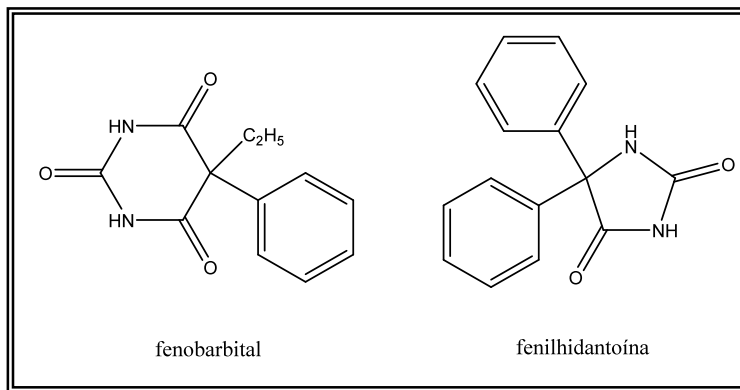


Figura 3. Ejemplo de algunos fármacos utilizados como antiepilépticos. ⁴⁴

Por otro lado, la limitación natural que existe al intentar estudiar la epilepsia en humanos mediante técnicas invasivas o ensayos farmacológicos ha creado la necesidad de buscar modelos experimentales de epilepsia que semejen al menos algunos aspectos de la epilepsia en humanos, existen diversos modelos de epilepsia y los principales criterios que se toman en cuenta para clasificar estos modelos experimentales de epilepsia son:

- El tiempo que transcurre entre el establecimiento del modelo, el inicio y duración de los fenómenos de hiperexcitabilidad cerebral. Los modelos pueden ser agudos o crónicos.
- El tipo principal de crisis epileptiformes. Así, hay modelos experimentales agudos y crónicos de crisis parciales simples, complejas, convulsiones tónico-clónicas generalizadas, crisis de ausencia y *status epilepticus*.

Los modelos agudos se inducen mediante la administración sistémica o la aplicación tópica en el cerebro de sustancias que activan sistemas excitatorios o inhibitorios de neurotransmisión para generar convulsiones o mediante la estimulación eléctrica, produciendo crisis parciales cuando se aplican en áreas localizadas del cerebro, y crisis generalizadas cuando son aplicadas de forma bilateral intracerebral o por vía sistémica.

Estos modelos son de utilidad para investigar los mecanismos que originan, mantienen y determinan la terminación de las crisis.

Los modelos crónicos pueden ser inducidos por lesiones estructurales permanentes y por estimulación eléctrica repetitiva del cerebro, o presentarse en animales genéticamente epilépticos, éstos se manifiestan por anomalías epileptiformes persistentes y reproducen en mayor grado la progresión de la epilepsia en humanos. Los modelos crónicos son útiles para conocer los sucesos clínicos inducidos por los fármacos en experimentación, ya que producen crisis espontáneas, estado epiléptico crónico y alteraciones histopatológicas cualitativamente similares a la esclerosis mesial temporal, observada en la epilepsia del lóbulo temporal, por lo que son considerados modelos de epileptogénesis.⁸

DOLOR Y NOCICEPCIÓN

El dolor es una experiencia emocional (subjetiva) y sensorial (objetiva), generalmente desagradable, asociada a una lesión tisular o expresada como si ésta existiera, siendo la causa más frecuente por la que consultan los pacientes a los médicos. Es un hecho que el dolor es una razón de incapacidad de miles de personas.

La enfermedad y el dolor han estado unidos a la vida durante la historia de la humanidad. Es así que, los remedios herbolarios para el tratamiento del dolor, forman parte de la riqueza cultural de nuestro país y del mundo, ejemplo de ello son algunas especies del género *Satureja* usadas en Irán por sus propiedades analgésicas, siendo, *Satureja hortensis* una de las doce especies más importantes cultivadas en Irán, esta *Satureja* se emplea como condimento en comidas típicas, y en el tratamiento del dolor y la inflamación, mientras que en México *Satureja mexicana* es empleada como analgésico, para el tratamiento de los “nervios” y como tranquilizante.⁹

Es a partir de la década de 1960 que el tratamiento del dolor ha evolucionado del empirismo a la terapéutica que se obtiene del conocimiento de la fisiopatología del dolor.

El dolor se puede clasificar de diferentes formas de acuerdo al tiempo de evolución en:

- Dolor agudo: puede ser provocado por una inflamación, daño en un tejido, lesión enfermedad o cirugía reciente, su duración puede ir de 3 a 6 meses, generalmente el dolor agudo puede ser controlado por medicamentos para el dolor.
- Dolor crónico: es aquel que persiste aún después de tratado o curado el problema, éste tiene una duración mayor a 6 meses, y a diferencia del dolor agudo no se sabe la causa que lo ocasiona.¹⁰

De acuerdo a su fisiología, el dolor se clasifica en:

- Dolor nociceptivo: es el dolor producido por una estimulación de los nociceptores, es decir los receptores del dolor, provocando que el “mensaje doloroso” sea transmitido a través de vías ascendentes hacia los centros supraespinales y sea percibido como una sensación dolorosa. Por ejemplo, un pinchazo o un estímulo térmico.
- Dolor neuropático: Es producido por una lesión directa sobre el sistema nervioso, de tal manera que el dolor se manifiesta ante estímulos mínimos o sin ellos y suele ser un dolor continuo.

Se denomina nocicepción a una serie de eventos neurofisiológicos producidos por la percepción de un daño, comprendidas en cuatro etapas principales: transducción, transmisión, modulación y percepción.

- La transducción es el proceso por el que los estímulos nocivos son convertidos en una actividad eléctrica a través de los receptores, generando un potencial de acción.

-
-
- La transmisión es el proceso por el que el potencial de acción se propaga a través de las vías del sistema nervioso periférico y el SNC hacia la corteza cerebral.
 - La modulación o antinocicepción es el proceso por el que la transducción y la transmisión son modificadas a través de diversas influencias neuronales.
 - La percepción es el proceso final por el que la transmisión, la transducción y la modulación interactúan con la psicología del paciente para crear la experiencia emocional, compleja e individual.¹¹

La nocicepción se desencadena cuando se producen sustancias llamadas prostaglandinas. Estas sustancias a su vez son generadas por la acción de enzimas que actúan sobre otros componentes de las células. Una de esas enzimas es la llamada ciclooxigenasa de la cual existen dos tipos: 1 y 2. La ciclooxigenasa 1 se encuentra en todos los tejidos, mientras la ciclooxigenasa 2 sólo está en los sitios en que ocurre inflamación y dolor, y en el riñón, es por esto que los analgésicos tienen también propiedades antiinflamatorias y antipiréticas (controlan la fiebre). El ketorolaco es uno de los fármacos analgésicos de uso común en la clínica, (DOLAC[®]) que inhibe la síntesis de prostaglandinas y no tiene ningún efecto sobre los receptores de los opiáceos, no afecta de forma importante al SNC y carece de propiedades sedantes y ansiolíticas, además, posee una eficacia analgésica comparable a dosis moderadas de morfina o peridina, con un inicio de acción más lento pero de mayor duración.¹²

Finalmente, es importante mencionar que la modulación del dolor es un proceso dinámico complejo, el cual involucra la interacción de sistemas neurales ascendentes y descendentes, en los que participan diversos sistemas de neurotransmisión, como el sistema opioide y noradrenérgico.¹³

ESTUDIO FITOQUÍMICO

La familia Lamiaceae, comúnmente conocida como la familia de la menta, está diversificada con una distribución cosmopolita, que comprende más de 6000 especies agrupadas en cerca de 220 géneros.¹⁴ Distribuidas en zonas húmedas y templadas alrededor del mundo. Algunas especies de esta familia son empleadas en la medicina tradicional, otras, como la menta, la salvia, el tomillo, el orégano, el romero, la melissa, tienen importancia económica debido a su contenido de aceites esenciales o por su uso como condimento.

Diversos estudios han determinado que la familia Lamiaceae es químicamente rica en compuestos de tipo terpenoide como constituyentes de sus aceites volátiles y flavonoides.¹⁵ Además en algunas especies existe la presencia de alcaloides, taninos, y saponinas, etc.¹⁶

Algunas lamiáceas son importantes por su uso en medicina tradicional, frecuentemente relacionados al contenido de diterpenos. Algunos ejemplos son: *Rabdosia* sp, *Coleus forskohlii*, y *Salvia miltiorrhiza*.¹⁷

El “toronjil de monte” (*Satureja mexicana* (Benth.) Briq.) es una especie perteneciente a la familia Lamiaceae, y del género *Satureja*, el cual está constituido por 284 especies. En México el género *Satureja* está representado por 13 especies distribuidas a lo largo de la República Mexicana.

El toronjil de monte se clasifica taxonómicamente en (Figura 4):

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobianta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Satureja*

Especie: *mexicana*

Figura 4. Taxonomía de toronjil de monte

Algunas especies del género *Satureja* son empleadas en la medicina tradicional, por sus efectos sobre SNC, ejemplo de ello es la *Satureja hortensis*, usada en Irán por su actividad analgésica. Los estudios fitoquímicos de esta especie revelan la presencia de carvacol, y otros monoterpenos, algunos flavonoides como apigenina y 4'-metoxiapigenina, y el ácido labiático como los principales componentes de las partes aéreas.¹¹ También, existen estudios sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Satureja subspicata*.¹⁸

Satureja thymbra y *Satureja spinosa* son plantas de la región mediterránea de las cuales se ha descrito la presencia de flavonoides comunes a ambas especies como naringenina, aromadendrina, eriodictyol, taxifolina, genkwanina, mientras que apigenina, se ha descrito en *S. spinosa*, y ladaneina para *S. thymbra*. Eriodictyol y taxifolina se han

descrito en *S. obovata*, y en *S. albina*. Apigenina y genkwanina fueron identificada en *S. montana*.¹⁹

El “toronjil de monte” (*Satureja mexicana* (Benth.) Briq.) (Figura 5). Pertenece al género *Satureja*, y es empleada en la medicina tradicional mexicana en el tratamiento de “los nervios” y por sus propiedades tranquilizantes. Sin embargo, existe escasa información sobre la química y farmacología de esta especie.



Figura 5. Toronjil de monte

Por otro lado, la familia Lamiaceae se caracteriza por la presencia de metabolitos secundarios de tipo flavonoide, los cuales son marcadores quimiotaxonómicos de los diversos géneros de esta familia. Además de que poseen una gran gama de funciones y actividades biológicas, los flavonoides pueden ser divididos en 3 grupos: flavonoides libres o agliconas, glicosidos flavonoides y antocianinas.¹³

Los flavonoides (del latín *flavus* “amarillo”) son un grupo de metabolitos secundarios fenólicos de bajo peso molecular. Son compuestos constituidos con una base de 15 átomos de carbono ($C_6C_3C_6$) formados por dos anillos aromáticos (anillos A y B), unidos por una cadena de 3 átomos de carbono (anillo C). (Figura 6). Se clasifican de acuerdo a su estructura química en flavonoles, flavonas, flavanonas (catequinas), antocianinas,

isoflavonas, dihidroflavanoles y chalconas, (Figura 7) dependiendo del estado de oxidación de la cadena de 3 átomos de carbono.

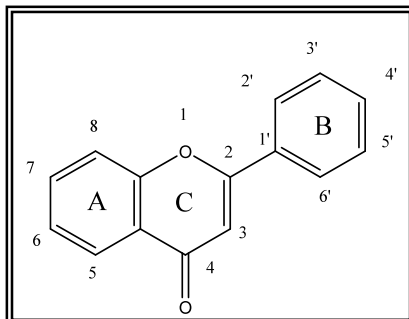


Figura 6. Esqueleto de flavonoide

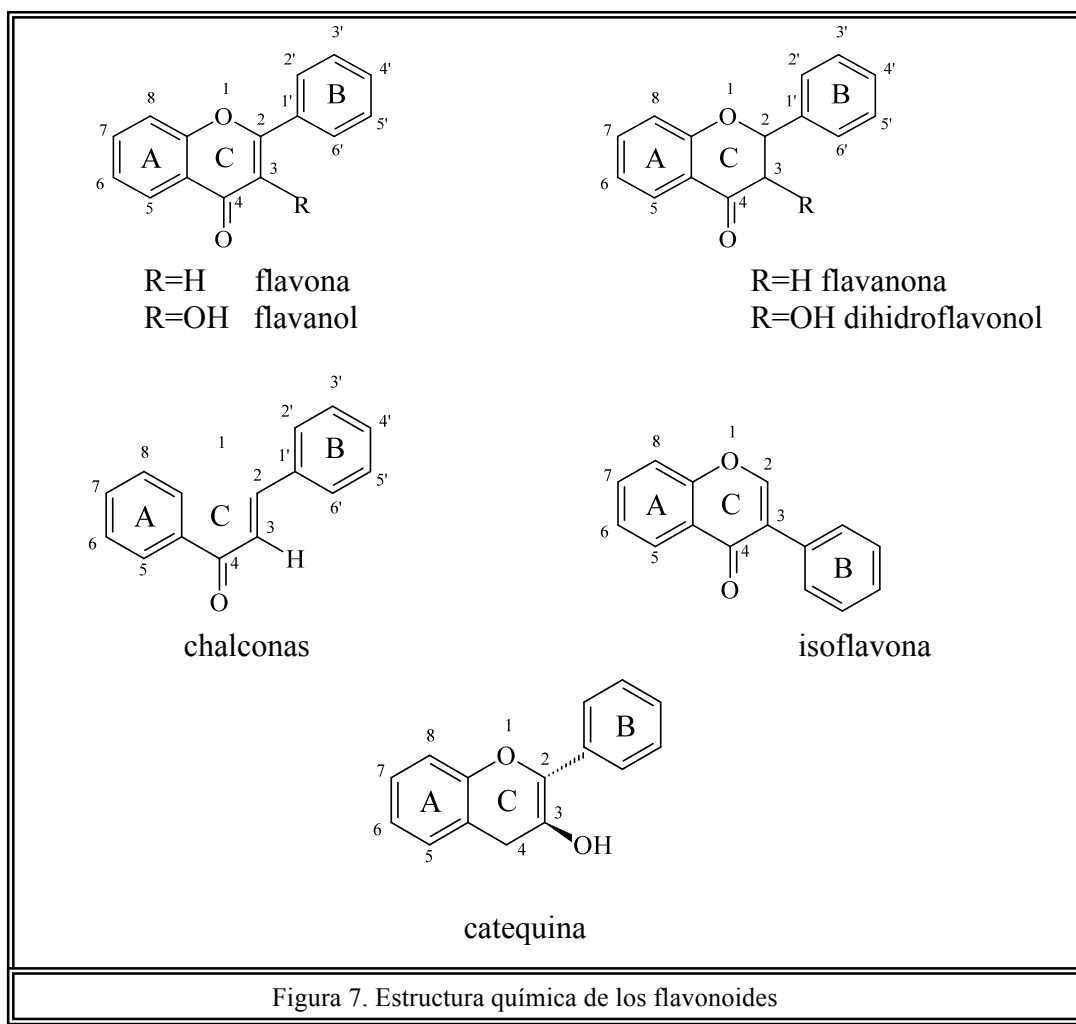


Figura 7. Estructura química de los flavonoides

Los flavonoides son biosintetizados mediante una ruta mixta (Figura 8) que involucra tanto la ruta del ácido siquímico como la ruta del acetato-malonato. El intermediario común de todos los flavonoides es la chalcona, su formación se produce por una condensación tipo Claisen entre p-cumaril-CoA con tres unidades de malonil-CoA, y a partir de éste derivan los diferentes tipos de flavonoides.

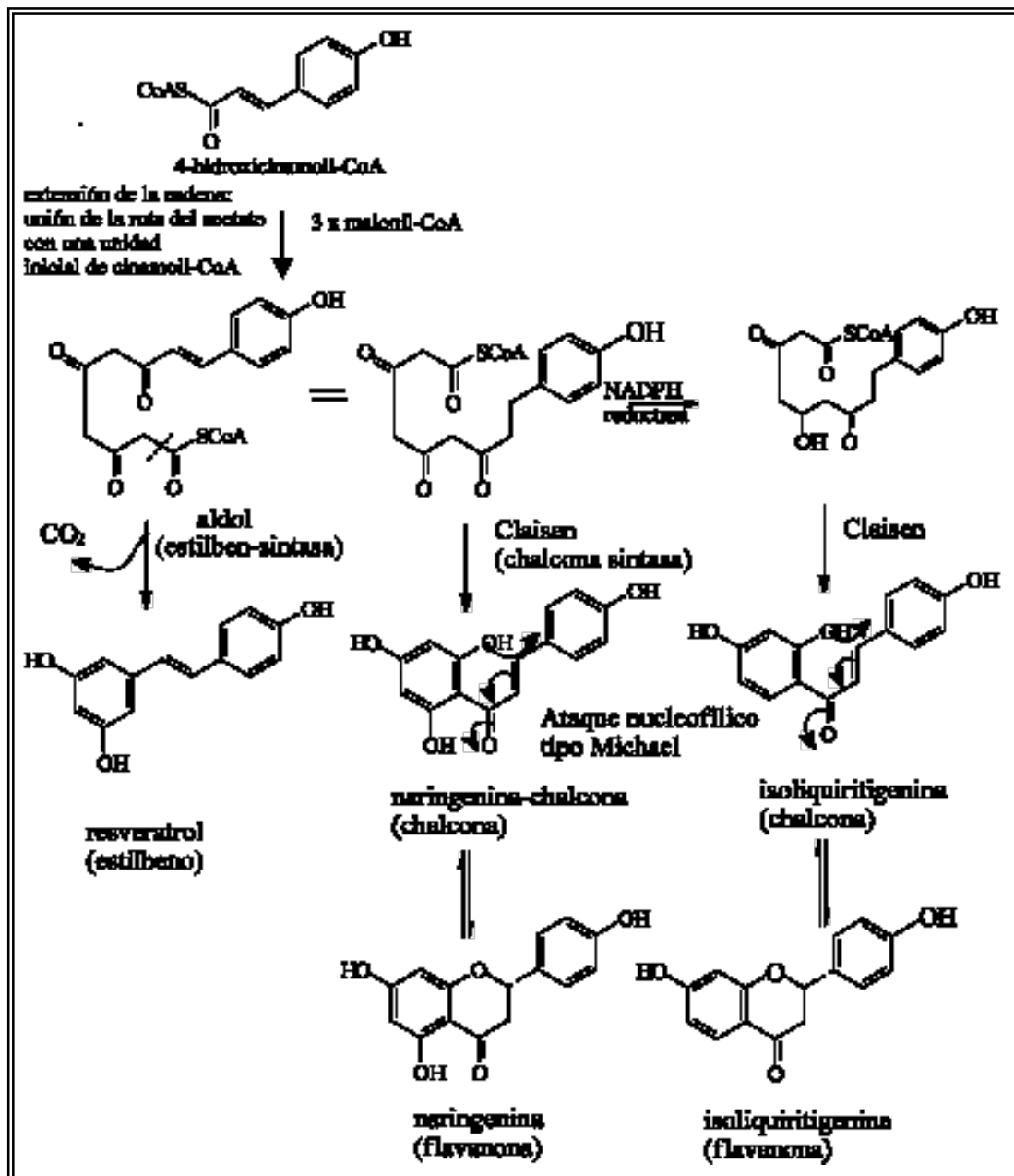


Figura 8. Ruta biogénica de los flavonoides.²⁰

Los flavonoides tienen una gran variedad de funciones biológicas, por ejemplo: confieren a las plantas resistencia contra la fotooxidación de la luz ultravioleta del sol, intervienen en el transporte de hormonas y algunos flavonoides funcionan como defensa ante depredadores. Una función importante que cumplen en muchas plantas es la atracción de los insectos polinizadores, a través del color que confieren a las plantas o a sus flores.

21,22



Figura 9. El color: función biológica de los flavonoides.

Adicionalmente, los flavonoides han adquirido interés científico debido a los efectos que ejercen en mamíferos, incluido el hombre, que los consume en los vegetales y frutas principalmente. Se ha descrito en literatura, que algunos flavonoides ejercen diversos efectos biológicos tales como: antimicrobianos, anticancerígenos, disminución del riesgo de enfermedades cardíacas, entre otros.

Recientemente los flavonoides han generado interés como nuevas entidades químicas con actividad en el SNC, es así que, se ha descrito la actividad ansiolítica de algunas flavonas como la apigenina, aislada a partir de la *Matricaria recutita*, la actividad antiepiléptica de crisina (Figura 10) aislada a partir de *Pasiflora caerulea* la actividad analgésica, antiinflamatoria y sedante de la hesperidina (Fig.12), aislada de *Saturja hortensis* y de diversas especies de cítricos. También, se ha demostrado que algunos flavonoides ejercen

su acción debido a que poseen afinidad por el sitio de unión de las benzodiazepinas en el receptor GABA_A.^{23 24}

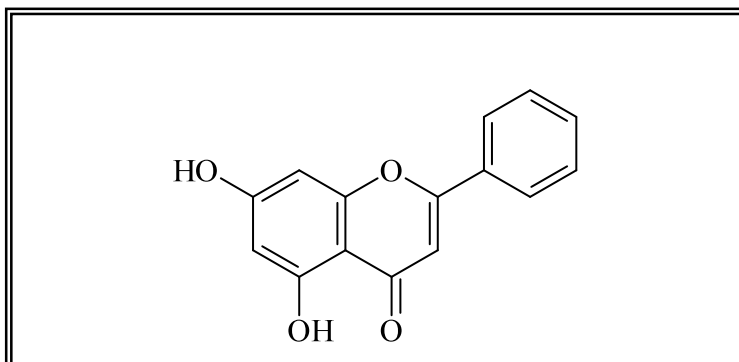


Figura 10. crisina

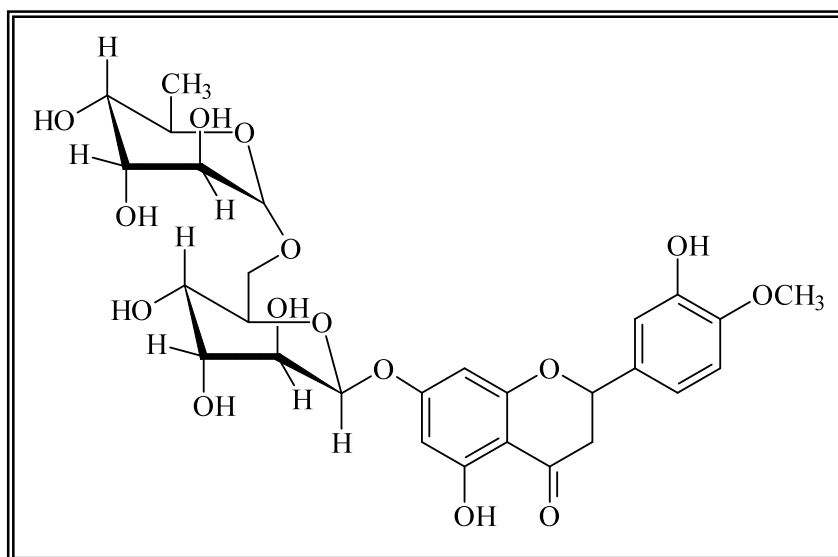


Figura 11. hesperidina.

3. HIPÓTESIS

El toronjil de monte es una planta utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de “los nervios” y por sus propiedades tranquilizantes por lo que es factible que un extracto acuoso de dicha especie posea efectos sobre el SNC.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Colecta e identificación de la planta

Las partes aéreas de “Toronjil de monte” *Satureja mexicana* (Benth.) Briq. se recolectaron en el municipio de Chilapa del estado de Guerrero, el 13 de abril del 2005, fueron identificados por la botánico M. R. García Peña, del Herbario Nacional de México (MEXU). Posteriormente, se secaron a temperatura ambiente y se molieron.

4.2 Obtención del extracto acuoso

La preparación del extracto acuoso de toronjil de monte se realizó agregando por cada 10 g de material vegetal 90 ml de agua hirviendo. La mezcla se mantuvo a ebullición durante 10 min al término del cual se dejó que la mezcla alcanzara temperatura ambiente, se filtró y liofilizó a -50°C y 0.01 mBarr en un equipo Telstar Cryodos.

4.3 Evaluación farmacológica

4.3.1. Diagrama de trabajo

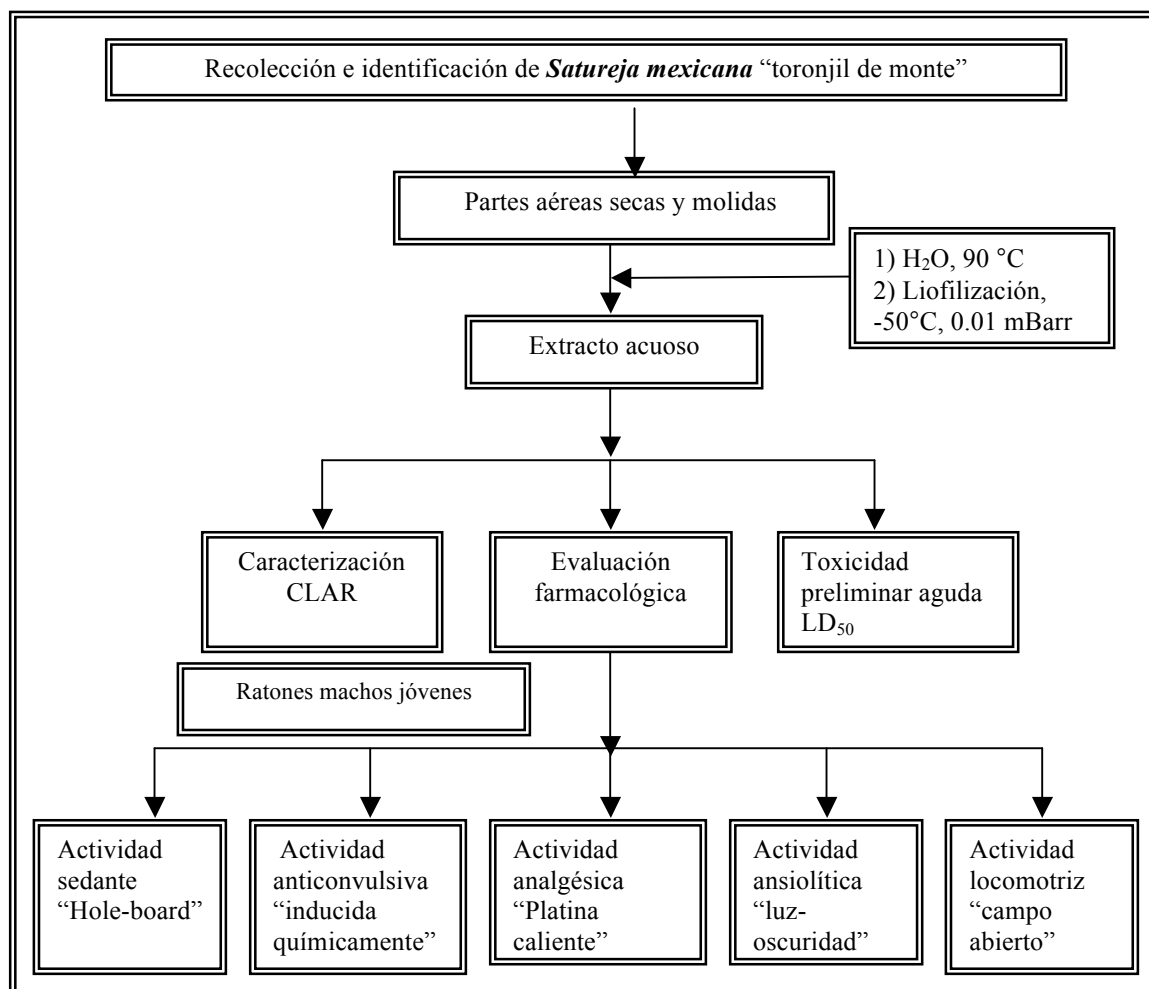


Figura 12. Diagrama de trabajo de la evaluación farmacológica del toronjil de monte.

4.3.2. Animales y fármacos

Se utilizaron ratones machos adultos (6-8 semanas) de la cepa Swiss Webster de 20-30 g de peso. Mantenidos en condiciones de ciclo invertido de luz-oscuridad (12 h/12 h) en un cuarto con control de temperatura automático (19-21 °C). Todos los animales tuvieron libre acceso a agua y alimento (purina). Tanto los fármacos como los extractos se prepararon antes de cada experimento y fueron administrados vía intraperitoneal, en una

relación de volumen de 10 ml/kg de peso del animal. Los animales fueron utilizados una sola vez. En todos los experimentos se utilizaron grupos de 8 a 10 animales por dosis.

El manejo de animales se realizó conforme a la NOM para el manejo y cuidado de animales (NOM-062-ZOO-1999) y aprobado por el Comité Institucional de Ética del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”.

En todos los experimentos los sujetos de prueba fueron administrados con el extracto acuoso de “toronjil de monte” a diferentes dosis 60 min antes de realizar la prueba correspondiente. Las dosis evaluadas en los diferentes modelos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Dosis del extracto acuoso de toronjil de monte evaluadas

Modelo	Dosis (mg/kg)					
DL ₅₀	10	100	1000	1600	2900	5000
Platina caliente	10	100	500	1000	1500	-
Luz/oscuridad	1	10	50	100	-	-
Campo abierto	1	10	50	100	-	-
Hole-board	1	5	10	100	-	-
Epilepsia	10	100	500	1000	1500	-

Los grupos de animales que se utilizaron como control, recibieron el mismo tratamiento, sólo que únicamente recibieron el vehículo (solución salina al 0.9 %). En todos los modelos se utilizó un grupo de referencia o control positivo; para los modelos de ansiedad, sedación y epilepsia se utilizó diazepam (0.5, 1, y 2 mg/kg, marca Roche), y en el modelo de analgesia se empleo ketorolaco (10, 20 y 30 mg/kg, marca sigma) como control positivo, en ambos casos el tiempo de latencia de administración fue de 30 min.

4.3.3. Efectos tóxicos generales

La toxicidad aguda del extracto fue evaluada, de acuerdo a una variación del método de Lorke,²⁵ mediante la determinación de su dosis letal media como índice de toxicidad. En una primera etapa, tres grupos de tres animales cada uno fueron administrados a 10, 100 y 1000 mg/kg del extracto, respectivamente. Posterior a la administración, los animales

fueron observados cuidadosamente durante el transcurso de 1 hora y después cada 12 horas durante 7 días. Se registraron los efectos tóxicos generales y el número de muertes para cada grupo. En una segunda etapa se emplearon grupos de tres animales de $n = 4, 5$ y 6 , los cuales fueron administrados con $1600, 2900$ y 5000 mg/kg, respectivamente, y se mantuvieron en observación de la misma forma que los animales de la primera etapa del experimento. Se registró el número de muertes, así como la presencia de signos de toxicidad generales.

4.3.4. Modelo luz-oscuridad “black & white” para evaluación de la actividad ansiolítica.²⁶

Se utilizó una caja de acrílico de $44 \times 21 \times 21$ cm, en la cual un tercio de la caja se encontraba completamente oscura mientras que los otros dos tercios estaban iluminados con un lámpara de luz fluorescente (560 luxes), las zonas se encontraban divididas por una pared de madera, con una abertura de 13×15 cm, a través de la cual el sujeto experimental tenía libre paso. La prueba duró 10 min. Al inicio de la prueba, el animal se colocó en el centro de la zona iluminada, se registró el número de transiciones que realizó de un compartimiento a otro. Entre cada ensayo la caja se limpió cuidadosamente usando una solución de EtOH al 1% y NH_4Cl al 2% . Un aumento en esta variable con respecto al control, sin modificación de la actividad locomotriz, se consideró como un efecto ansiolítico. Los resultados fueron expresados como número de transiciones/ 10 min. Inmediatamente, después de la prueba de luz/oscuridad se evaluó la actividad locomotriz para descartar efectos inespecíficos del extracto.

4.3.5. Modelo campo abierto para la evaluación de la actividad locomotriz

La evaluación de la actividad locomotriz se realizó en una caja de 43 por 36 por 19 cm, dividida en seis cuadrantes simétricos. El sujeto experimental se colocó en la caja y el número de cruces que realizó el animal fue registrado durante un periodo de 5 min. Después de cada prueba, la caja se limpió cuidadosamente. Los resultados se expresan como cuentas/5 minutos.

4.3.6. Modelo de inducción química de convulsiones para la evaluación de la actividad anticonvulsiva.²⁷

Los animales fueron administrados con diferentes dosis del extracto y una hora después fueron administrados con PTZ (90 mg/kg, Aldrich) como inductor de convulsiones, después de la administración, los animales fueron colocados individualmente en cajas con aserrín, y fueron observados cuidadosamente hasta su total recuperación o muerte. Se registraron: el tiempo de latencia de la primera crisis; (como el tiempo transcurrido entre la administración de PTZ a la aparición de la primera crisis), el número de mioclonias, el tiempo de latencia de la crisis tónica (considerada como el estiramiento sostenido del ratón), y el tiempo de muerte (cuando esto sucedió). Una disminución en el número de crisis, el aumento en el tiempo de latencia de crisis o una disminución en el porcentaje de muerte se consideró como un efecto anticonvulsivo.

4.3.7. Modelo platina caliente para la evaluación de la actividad nociceptiva.²⁸

La actividad antinociceptiva se evaluó utilizando una platina a 53.3 °C, en la cual, se colocó el sujeto experimental en el centro, y se registró la latencia y el número de flexiones de alguna de las patas posteriores y el número de lamidas de las mismas. La prueba duró 50 segundos, al término de la cual se retiró el animal y se limpió

cuidadosamente la platina. Un aumento en el tiempo de latencia de flexiones y lamidas, y una disminución en el número de flexiones y lamidas con respecto al control, fue considerado como un efecto antinociceptivo. Debido a que las respuestas de los sujetos experimentales ante el estímulo térmico suponía un movimiento de las patas traseras, se realizó la prueba de campo abierto para descartar que la falta de respuesta tras el tratamiento se debiera a un efecto sedante o inespecífico y no a un efecto antinociceptivo.

4.3.8. Modelo de tablero con perforaciones “Hole-Board” para la evaluación de la actividad sedante.²⁹

La prueba consiste en un tablero de 60 por 30 cm con paredes de acrílico de 15 cm de altura, el cual está dividido en 10 cuadrantes simétricos de 12 por 15 cm y tiene 4 perforaciones equidistantes de 2 cm de diámetro. La prueba se realizó en condiciones de ciclo de luz invertido. El sujeto experimental se colocó en el centro del tablero y se observó la conducta exploratoria durante 5 minutos, se registró el número de paradas considerado como el número de veces que el animal se sostuvo sobre las patas traseras, el número de cuentas fue registrado cada vez que el animal cruzaba de un cuadrante a otro, el número de asomadas como el número de veces que el animal exploró algunas de las perforaciones, el tiempo de latencia de la primera exploración considerado como el tiempo que el animal tarda en asomarse por vez primera en cualquiera de las perforaciones, y el tiempo de exploración considerado como el tiempo que el animal mantuvo 1/3 de la cabeza en cualquier perforación. El tablero se limpió previo al inicio de cada ensayo. Una disminución en el tiempo de latencia de exploración y el aumento en el tiempo de asomadas, sin modificar la actividad locomotriz, con respecto al control se consideró como un efecto ansiolítico. Mientras que un aumento en el tiempo de latencia de exploración y la

disminución en el tiempo de asomadas y actividad locomotriz se consideró como un efecto sedante.

4.3.9. Estadística

Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar medio, de grupos de 8 a 10 ratones. La comparación entre los grupos experimentales y los grupos control se realizó mediante el análisis de varianza de una sola vía de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba pareada de Mann-Whitney. ($p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$ y $p^{***} < 0.001$). Todos los análisis estadísticos y gráficos se realizaron en el programa Sigmastat 2.0 y Excel, respectivamente.

4.4 Estudio fitoquímico

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johns, utilizando un termómetro Kane-M y no fueron corregidos.

Se usaron cromatofolios Macherey-Nagel para la cromatografía en capa fina, usando como revelador una solución de sulfato cérico al 1 % en ácido sulfúrico 2N.

Los espectros de masas fueron determinados en un espectrómetro de masas JEOL J MS-AX505HA, mediante la técnica de Impacto Electrónico a 70 eV.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear fueron determinados en instrumentos: Varian Unity 300.

Los desplazamientos químicos de los espectros RMN ^1H están en ppm con respecto al TMS, y los de RMN ^{13}C (75 ppm). Las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hz.

Todos los espectros de RMN y masas fueron adquiridos en el Instituto de Química, de la UNAM.

Para las cromatografías relámpago se utilizó sílica gel de malla 230-400 (J. T. Baker) y para las cromatografías al vacío se utilizó sílica gel para cromatografía en placa.

4.4.1. Diagrama de trabajo.³⁰

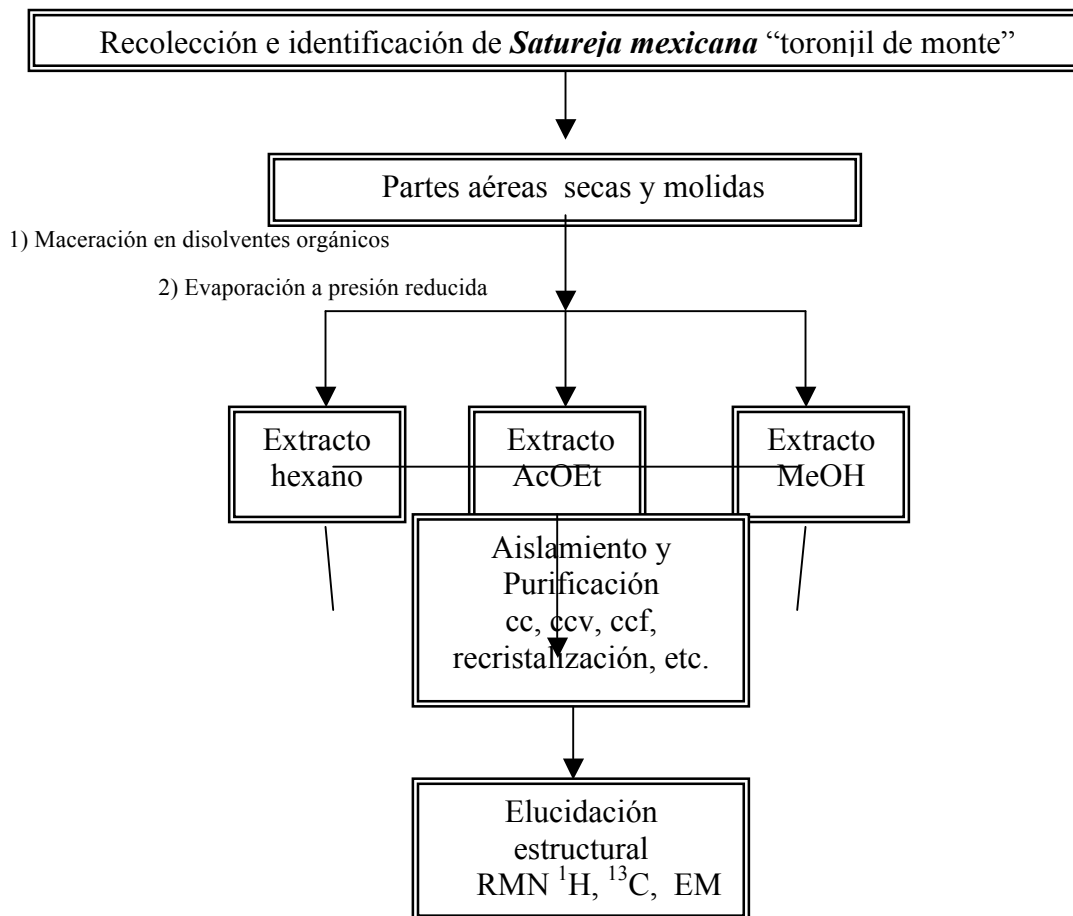


Figura 13. Diagrama de trabajo del estudio fitoquímico de toronjil de monte.

Obtención de los extractos

La extracción se realizó a partir de 100 g de toronjil de monte usando hexano, acetato de etilo y metanol, sucesivamente. La extracción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante un periodo de una semana cada uno, el disolvente se filtró y se evaporó a presión reducida, obteniéndose 3.65 g (3.65 %) de extracto de hexano, 8.5 g (8.5 %) de extracto de acetato de etilo y 9.6 g (9.6 %) de extracto de metanol.

Los extractos fueron trabajados por separado y separados en sus componentes mediante el empleo de cromatografía en columna al vacío con Sílice (60 G Merck) en proporción de 35 veces en peso con respecto al extracto, se utilizó como eluyente hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo de polaridad creciente, acetato de etilo, mezclas de acetato de etilo-metanol de polaridad creciente, y metanol.

Extracto de hexano

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (10/90) se obtuvo **β -sitosterol**, (10 mg, 0.01 %) como un sólido blanco cristalino con un pf = 133-135 °C, (pf = 139-140 °C descrito).³¹

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (20/80) se aisló **ácido ursólico** (25 mg, 0.025 %) como un sólido amorfo blanco, con un pf = 267-269 °C. (pf = 284-285 °C descrito).²⁷

Ambos productos fueron identificados mediante la comparación de sus datos espectroscópicos con los descritos en la literatura.

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (40/60) se obtuvo, mediante recrystalización, en un sistema de AcOEt/hexano, una mezcla de **5,8-dihidroxi-6, 7, 4'- trimetoxiflavona**, como un sólido cristalino amarillo (54 mg, 0.054 %), esta mezcla fue reunida con las fracciones eluidas con hexano/ AcOEt (60/40) del extracto de AcOEt.

Extracto de Acetato de Etilo

Las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (60/40) se reunieron y se recromatografiaron en una columna relámpago³² de 1 cm de diámetro y 10 cm de altura empacada con sílice (malla 230-400) utilizando como eluyente una mezcla de CHCl₃/MeOH al 0.1 %, de esta cromatografía se aislaron 15 mg (0.015 %) de **5,8-dihidroxi-6,7,4'- trimetoxiflavona**, como un sólido cristalino amarillo, con punto de

fusión 270-274 °C. (pf = 199-200 °C descrito).³³ A continuación se describen sus características espectroscópicas. (Figura 15 y 16).

EM: IE m/z 344 [M⁺] (90) (C₁₈H₁₆O₇), 327 [M⁺-17] (100), 210 (25). (Espectro 1)

RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz), δ(ppm), (J, multiplicidad, J, asignación): 12.65 (s, H-5) y 9.6 (s, H-8), 7.85 y 6.99 (4H, sistema AA'BB', J = 8.7, H-2' y H-6', H-3' y H-5'), 6.6 (1H, s, H-3), 4.10, 3.97, y 3.94, (3H, s, 6-OCH₃, 7-OCH₃, y 4'-OCH₃, señales intercambiables). (Espectro 2).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75MHz), δ(ppm), (asignación): 159.1 (C-5), 149.5, 128.0 (C-2' y C-6'), 116.2 (C-3' y C-5'), 103.8 (C-2), 62.1, 61.1, 56.1. (-OCH₃, C-6, C,7 y C-8, señales intercambiables) (Espectro 3).

Las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (60/40) se reunieron y se recromatografiaron en una columna relámpago de 1 cm de diámetro y 10 cm de altura empacada con sílice (malla 230-400) utilizando como eluyente una mezcla de cloroformo/metanol al 0.1 %, de esta cromatografía se aislaron 98.4 mg. (0.098 %) de **5-hidroxi-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavona** o **5-desmetoxinobiletina**,³⁴ como un sólido cristalino amarillo, con pf = 177-178 °C.

(pf = 145-146 °C).³⁵

EM: IE m/z (abundancia relativa) 388 [M⁺] (55) (C₂₀H₂₀O₈), 373 [M⁺-15] (95), 211 (15), 119 (5), 85 (100). (Espectro 4)

RMN ¹H (CDCl₃, 300MHz), δ(ppm), (J, multiplicidad, J, asignación): 7.60, (1H, dd, J = 8.4, 2.1, H-6'), 7.42 (1H, d, J = 2.1, H-2'), 7.01 (1H, d, J = 8.7, H-5'), 6.63 (1H, s, H-3), 4.12, 4.00, 3.99, 3.98, 3.97 (3H, s, 6-OCH₃, 7-OCH₃, 8-OCH₃, 3'-OCH₃, 4'-OCH₃, (señales intercambiables) (Espectro 5)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz), $\delta(\text{ppm})$, (asignación): 182.9 (C-4 carbonilo), 163.93 (C-2) y 62.07, 61.72, 61.13, 56.13, 56.02, (correspondientes a 5 - OCH_3) (Espectro 6).

Las fracciones eluidas con AcOEt /MeOH (80/20) se reunieron y se separaron por medio de cromatografía de capa preparativa, utilizando, como medio de elusión una mezcla de hexano/cloruro de metileno/metanol (20/60/20), de la cual se aislaron 116 mg (0.116 %) de **neoponcirina** como un sólido blanco, con punto de fusión de 256 °C (pf = 210-212 °C descrito).³⁶

EM: IE m/z 594 [M^+] ($\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{14}$) no se observa la señal en el espectro, 286 (34), 256 (38), 245 (15), 134. (Espectro 7).

RMN ^1H (DMSO, 300MHz), $\delta(\text{ppm})$, (f , multiplicidad, J , asignación): 12.01, (1H, s, 5-OH), 7.46, 6.97 (4H, sistema AA'BB', $J = 8.7$, H-2' y H-6', H-3' y H-5'), 6.12 (2H, s, 6-H, 8-H), 5.56 (1H, dd, H-2), 4.96 ($J = 7.2$, anomérico de glucosa), 4.50 (anomérico de ramnosa) (Espectro 8).

RMN ^{13}C (DMSO, 75 MHz), $\delta(\text{ppm})$, (asignación): 196.99 (C-4 carbonilo), 165.1 (C-5), 162.97, 162.52, 159.47, (C-9, C-10, C-1') señales intercambiables, 159 (C-4'), 128.4 (C-2', C-6'), 113.87 (C-3', C-5'), 103.2 (anomérico de ramnosa), 100.5 (anomérico de glucosa), 96.4 (C-6), 95.4 (C-8), 78.2 (C-2), región de 76.2 a 65.9 (C-O, de glucosa y ramnosa), 55.1 (- OCH_3), 41.8 (C-3), 17.76 (- CH_3 de la ramnosa), (Espectro 11).

Las fracciones eluidas con AcOEt /metanol (80/20) se reunieron y se separaron por medio de cromatografía de capa preparativa, utilizando como medio de elusión una mezcla de hexano/cloruro de metileno/metanol (20/60/20), de la cual se aisló **hesperidina** (10 mg, 0.01 %)³⁷, como un sólido blanco, cuyo punto de fusión fue superior a los 280 °C (pf = 257-260 °C descrito).³⁸

EM: IE m/z 610 [M⁺] (C₂₈H₃₄O₁₅), no se observa en el espectro 286 (80), 134 (100) (Espectro 12)

RMN ¹H (DMSO, 300 MHz), δ(ppm), (f, multiplicidad, J, asignación): 7.45 (2H, dd, J = 9, 2.4, H-6' y H-2'), 6.97 (2H, d, J = 7.8, H-5'), 6.1 (2H, s ancho, H-6, H-8), 5.56 (1H, dt, J = 12.6, 3.3, H-2), 4.96 (1H, m, J = 7.2, H-1 anomérico de glucosa), 4.51 (1H, s ancha, H-1 anomérico de ramnosa), 2.78 (1H, m, J = 18.3, 3.3, H-3 eq), 1.091 (3H, dd, J = 6.3, 1.5, -CH₃ de la ramnosa) (Espectro 13).

RMN ¹³C (DMSO, 75 MHz), δ (ppm), (asignación): 196.85 (C-4 carbonilo), 165.02 C-5, 162.9 C-3', 162.5 C-9, 159.39 C-4', 130.29 C-1', 128.32 y 128.14 (C-2' y C-6'), 113.87 C-10, 98.95 96.49, 95.35 (C-6,C-7 y C-8, señales intercambiables), 78.19 C-2, de 76.22 a 68.22 (C base de oxígeno correspondientes a la glucosa y ramnosa), 55.12 (-OCH₃), 17.73 (-CH₃ de la ramnosa) (Espectro 14).

Extracto de metanol

Las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (80/20) se reunieron ya que mostraron el mismo perfil cromatográfico en ccf. De igual forma, se comparó su perfil cromatográfico con la fracción eluida con hexano/AcOEt (60/40) del extracto de acetato de etilo y con la fracción eluida con hexano/AcOEt (40/60) del extracto de hexano, las cuales presentaron el mismo perfil en ccf y se trabajaron de la misma forma.

De las fracciones eluidas con AcOEt/MeOH (80/20) se obtuvo un sólido amorfo blanco, obteniéndose 2516 mg (2.516 %). Mediante el análisis en ccf usando como medio de elusión una mezcla de hexano/CH₂Cl₂/MeOH (20/60/20), se observó que el sólido esta constituido por una mezcla de tres metabolitos de tipo flavonoide, de acuerdo a su perfil mostrado se identificaron como **neoponcirina**, **hesperidina**, y el último se determinó como

naringenina¹⁸ por medio de cromatografía en capa fina comparado con una muestra auténtica.

Por último, en las Tablas 1 y 2 se resumen las características espectroscópicas de los metabolitos aislados.

Tabla 3. Datos de RMN ¹H para los flavonoides aislados

H	8-hidroxisalvigenina	5-desmetoxinobiletina	neoponcirina	hesperidina
2	-	-	5.56 dd	5.56 dt (J = 12.6, 3.3)
3	6.6 s	6.63 s	-	2.78 m (J = 18.3, 3.3)
5	12.65 s	-	-	-
6	-	-	6.12 s	6.1* s
8	9.6 s	-	6.12 s	6.1* s
2'	7.81 y 6.99 (dd, J = 8.7)	7.42 d (J = 2.1)	7.46 y 6.97 (dd, J = 8.7)	7.45 dd (J = 9, 2.4)
3'	7.81 y 6.99 (dd, J = 8.7)	-	7.46 y 6.97 (dd, J = 8.7)	-
5'	7.81 y 6.99 (dd, J = 8.7)	7.01 d (J = 8.7)	7.46 y 6.97 (dd, J = 8.7)	6.97 d (J = 7.8)
6'	7.81 y 6.99 (dd, J = 8.7)	7.60 dd (J = 8.4, 2.1)	7.46 y 6.97 (dd, J = 8.7)	7.45 dd (J = 9, 2.4)
6-OCH ₃	4.10 s*	4.12*	-	-
7-OCH ₃	3.97 s*	4.00*	-	-
8-OCH ₃	-	3.99*	-	-
3-OCH ₃	-	3.98*	-	-
4'-OCH ₃	3.94 s*	3.97*	-	-
5-OH	-	-	12.01 s	-
Anomérico de glucosa	-	-	4.96 (J = 7.2)	4.96 m (J = 7.2)
Anomérico de ramnosa	-	-	4.50	4.51 s
-CH ₃ de la ramnosa	-	-	-	1.091 dd (J = 6.3, 1.5)

*señales intercambiables

Tabla 4. Datos de RMN ¹³C para los flavonoides aislados

C	8-hidroxisalvigenina	5-desmetoxinobiletina	neoponcirina	hesperidina
2	103.8	163.93	78.2	78.19
3	-	-	41.8	-
4	-	182.9	196.99	196.85
5	159.1	-	165.1	165.02
6	-	-	96.4	98.95*
7	-	-	-	96.49*
8	-	-	95.4	95.35*
9	-	-	162.97	162.5
10	-	-	162.52	113.87
1'	-	-	159.47	130.29
2'	128.0*	-	128.4	128.32
3'	116.2*	-	113.87	162.9
4'	-	-	159	159.39
5'	116.2*	-	113.87	
6'	128.0*	-	128.4	128.14
-OCH ₃	62.1, 61.1, 56.1	62.07, 61.72, 61.13, 56.13, 56.02	55.1	55.12
Anomérico de Glu	-	-	100.5	-
Anomérico de Rha	-	-	103.2	-
C-O de Glu y Rha	-	-	76.2-65.9	76.22-68.22
- CH ₃ de Rha	-	-	17.76	17.73

*señales intercambiables

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La toxicidad de sustancias o extractos potencialmente activos es importante debido a que nos permite diferenciar entre un efecto biológico verdadero de un efecto observado en consecuencia de la toxicidad generada por la sustancia, por lo que previo a la evaluación farmacológica del extracto acuoso de *Satureja mexicana*, se realizó la evaluación de la toxicidad aguda mediante la determinación de la DL_{50} . En esta evaluación únicamente a la dosis de 2900 mg/kg ocurrió la muerte de los sujetos experimentales, por lo cual la DL_{50} , se determinó como la media geométrica de las dosis a las cuales se produjo 0 y 100 % de muerte, siendo esta 2159 mg/kg, por lo que el extracto acuoso de toronjil de monte puede ser considerado como ligeramente tóxico, según el método de Lorke.²⁴

Los modelos de conducta animal son una buena herramienta para la evaluación farmacológica de nuevos fármacos o principios activos, para el tratamiento de trastornos que afectan el SNC como la ansiedad, la epilepsia y los trastornos del sueño, brindando una buena aproximación de los efectos que ejercen, así como, los posibles efectos colaterales. El extracto acuoso del toronjil de monte (EATM) fue evaluado en el modelo de dolor agudo de la platina caliente, en el cual se evaluaron las respuestas específicas evocadas por un estímulo térmico. La Figura 14 ilustra que el EATM produce una disminución en el número de flexiones a medida que aumenta la dosis, la cual es estadísticamente significativa, únicamente a las dosis de 500 mg/kg ($H = 26.1$, $gl = 8$, $P = 0.0010$). El número de lamidas se reduce en todos los casos de una manera dependiente de la dosis, ($H = 22.5$, $gl = 8$, $P = 0.0004$), con respecto al control. También, en la Figura 15 se ilustra un aumento en el tiempo de latencia tanto de lamidas como de flexiones dependiente de la dosis ($H = 32.8$, $gl = 8$, $P = 0.0001$). Estos resultados muestran que el EATM ejerce un efecto antinociceptivo en los animales de prueba. Resulta importante mencionar que en el EATM se detectó

mediante CLAR, la presencia de hesperidina, este metabolito fue uno de los constituyentes mayoritarios de naturaleza flavonoide obtenido de los extractos orgánicos del toronjil de monte, de los cuales ha sido descrito en la literatura su actividad analgésica,²⁰ por lo que probablemente estos sean responsables de los efectos observados para EATM.

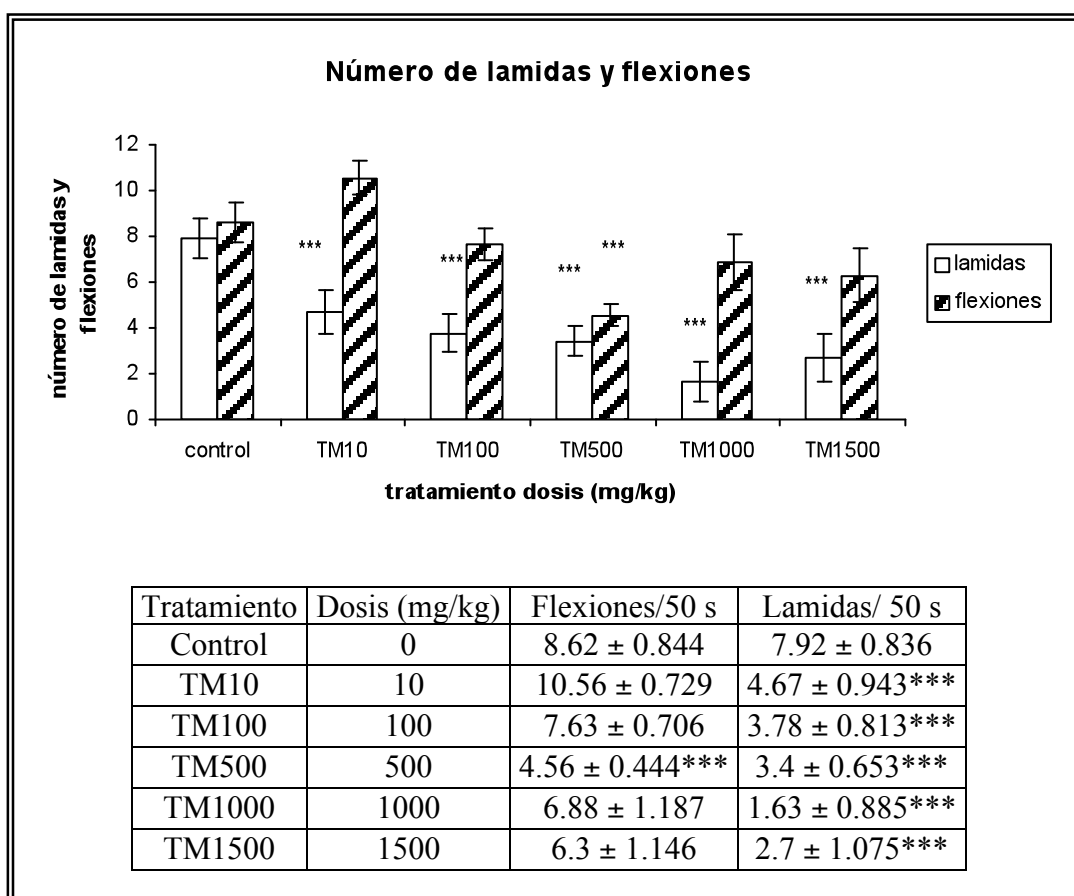


Figura 14. Evaluación del efecto analgésico de EATM en el modelo de platina caliente
 *** diferencia estadística $p < 0.001$

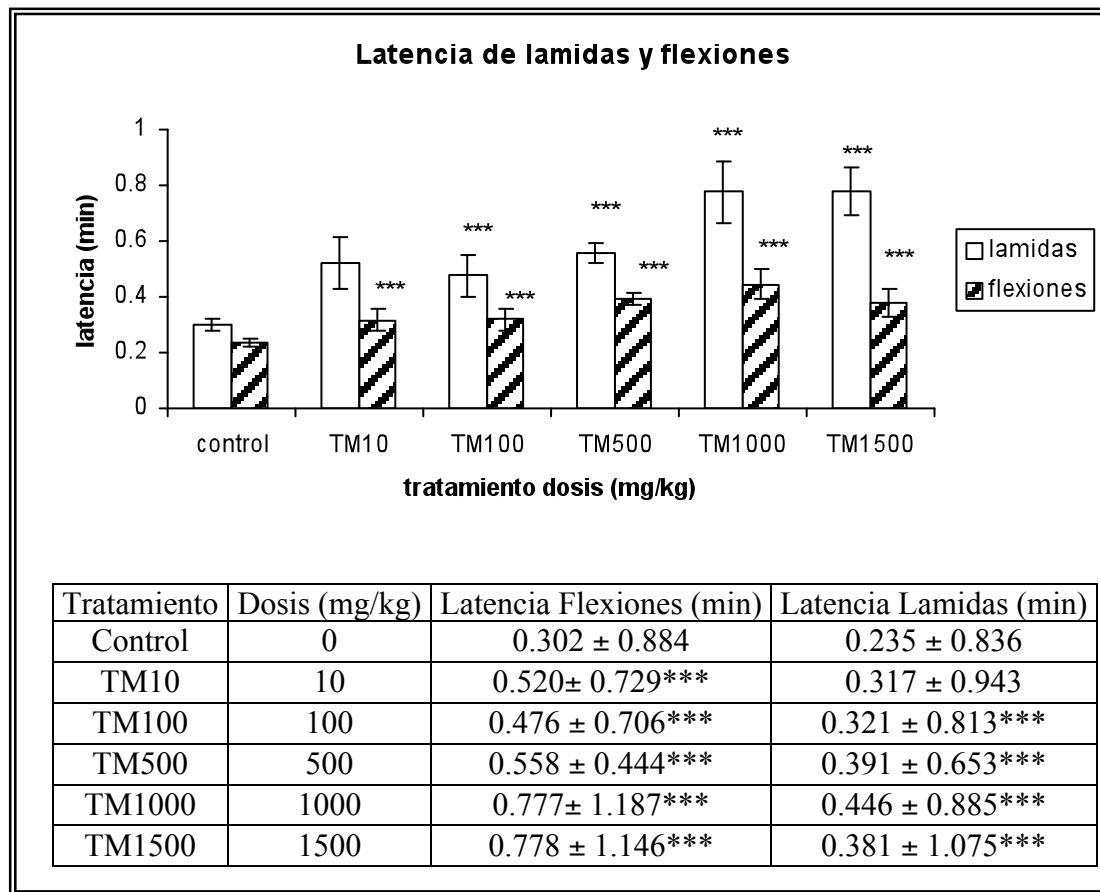


Figura 15. Evaluación del efecto analgésico de EATM en el modelo platina caliente
 *** diferencia estadística $p < 0.001$

El efecto ansiolítico del EATM se evaluó en el modelo de conducta animal de luz-oscuridad, el cual se basa en la conducta normal de los roedores a explorar zonas desconocidas y evitar estímulos que les resulten hostiles, como el provocado por una fuente de luz, descrito por Crawley en 1981.³⁹ El EATM produce una disminución en el número de transiciones de un compartimiento a otro de manera dependiente de la dosis ($H = 80.9$, $gl = 9$, $P = 0.0001$; Figura 16), así mismo ejerce una disminución en la actividad locomotriz de los animales de prueba (Figura 17). Los resultados fueron contrastados con lo observado con la administración de diazepam (DZ), un ansiolítico empleado en la clínica, el cual produce un aumento en el número de transiciones sin afectar la actividad locomotriz, lo

cual es considerado en este modelo como un efecto ansiolítico del DZ. Estos resultados indican que en este modelo el EATM ejerce un efecto inespecífico, no observándose un efecto ansiolítico a las dosis probadas.

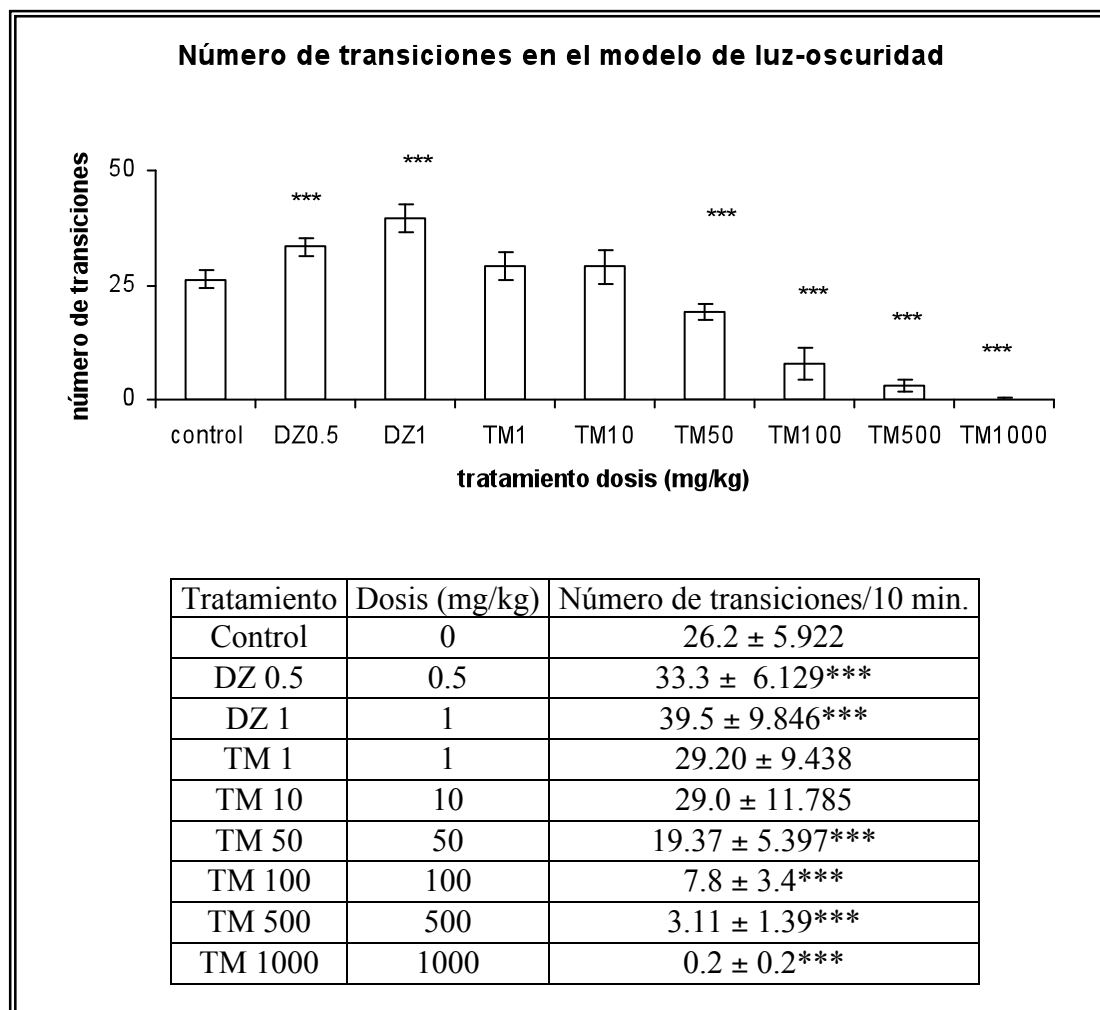


Figura 16. Evaluación del efecto ansiolítico de EATM en el modelo de luz-oscuridad.
*** diferencia estadística $p < 0.001$

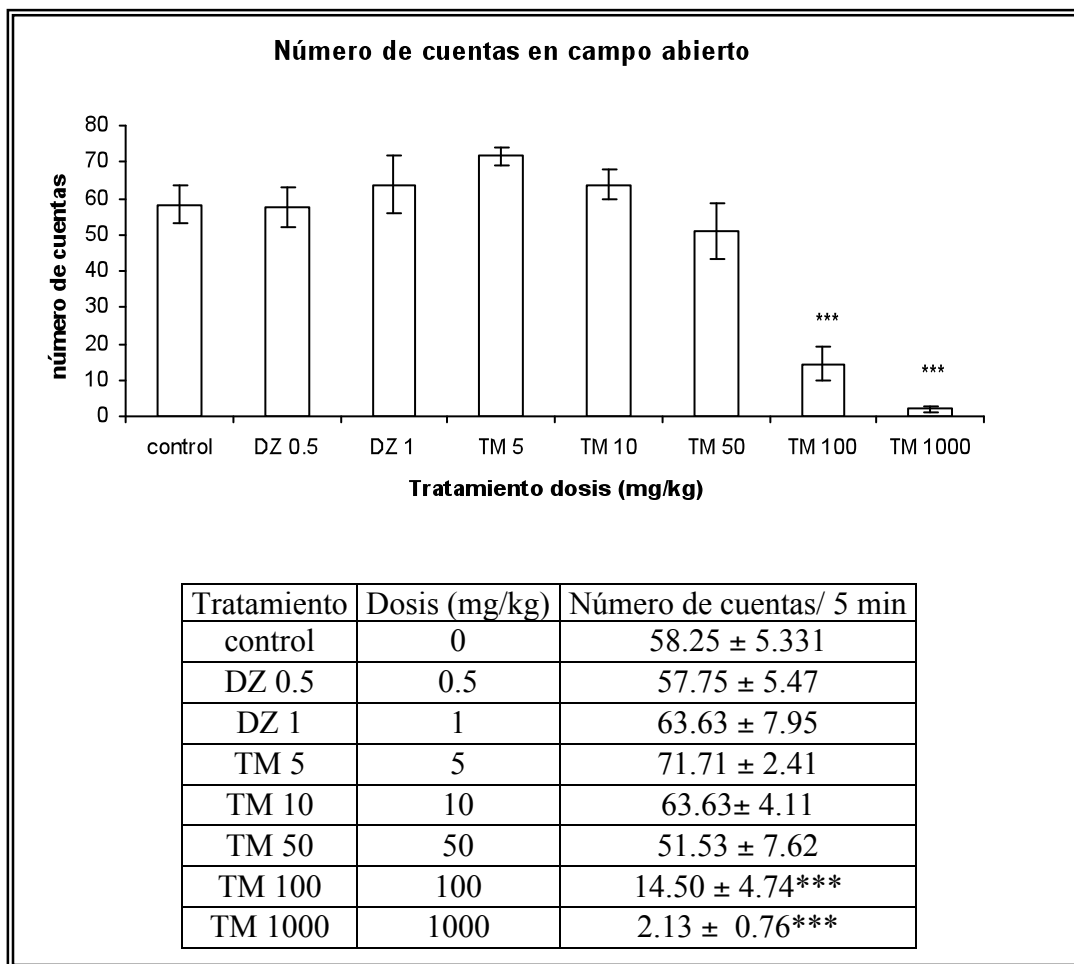


Figura 17.. Evaluación de la actividad locomotriz de EATM en el modelo de campo abierto.
 *** diferencia estadística $p < 0.001$

La actividad ansiolítica y/o sedante fue evaluada en el modelo Hole-board el cual está basado en la conducta normal de los ratones a explorar su entorno. El modelo nos provee medidas independientes de actividad motora y exploración.

Como se muestra en la Figura 18 el EATM produjo una disminución en el número de cuentas ($H = 28.4$, $gl = 7$, $P = 0.0002$) y paradas ($H = 39.1$, $gl = 7$, $P = 0.0001$) de manera dosis dependiente de los sujetos experimentales con respecto al grupo control. Este comportamiento es similar al observado para DZ a la dosis en que ejerce un efecto sedante en este modelo (2.0 mg/kg). La Figura 19 ilustra que, únicamente a la dosis de 10 mg/kg de EATM produce un aumento en el tiempo de asomadas para la ($H = 27.2$, $gl = 7$, $P =$

0.0003), de forma similar al efecto producido por DZ 2.0 mg/kg. Mientras que a dosis superiores a 10 mg/kg produjo una disminución de la actividad locomotriz son provocar cambios significativos en el número ni tiempo de asomadas, por lo anterior, en este modelo, el EATM, no ejerce un efecto sedante, aunque la disminución producida por el EATM en el número de transiciones y paradas indican un probable efecto de relajación muscular. Sin embargo, es necesario evaluar el EATM en un modelo específico para este efecto.

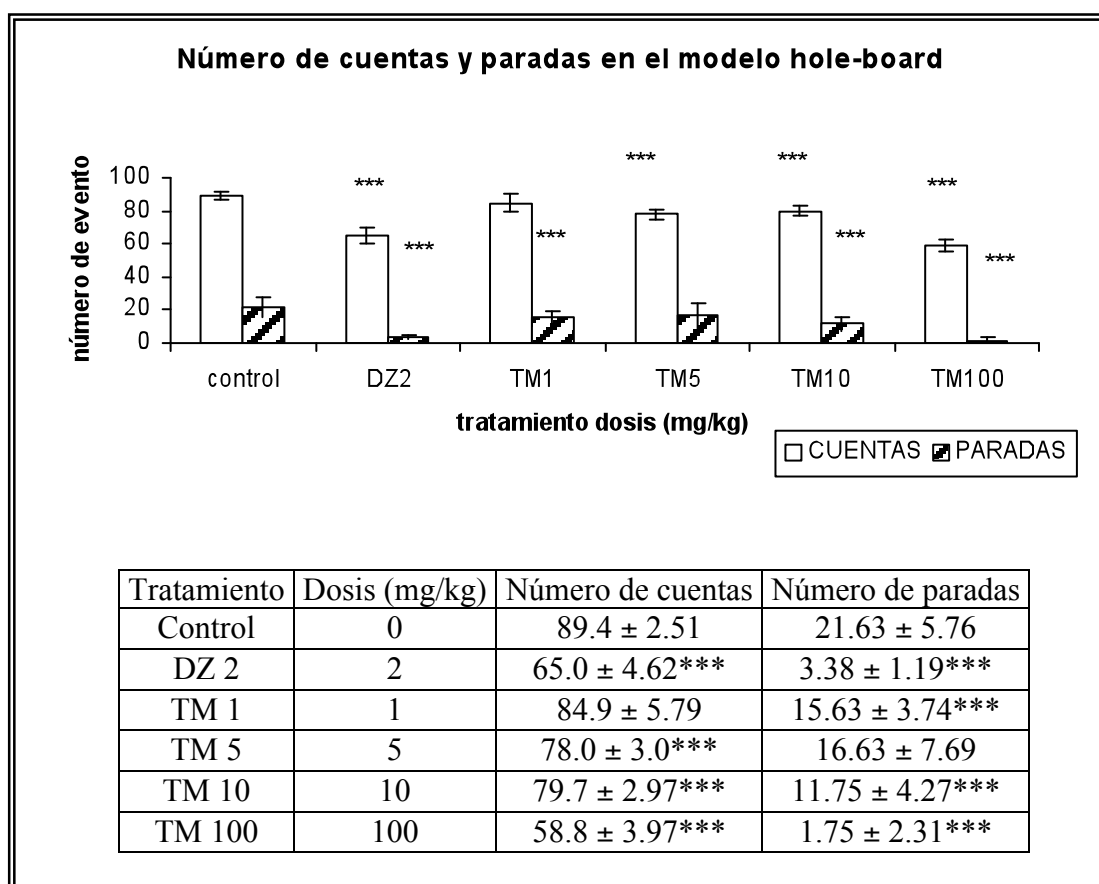


Figura 18. Evaluación del efecto ansiolítico y/o sedante de EATM en el modelo "Hole-board".
 *** diferencia estadística p <0.001

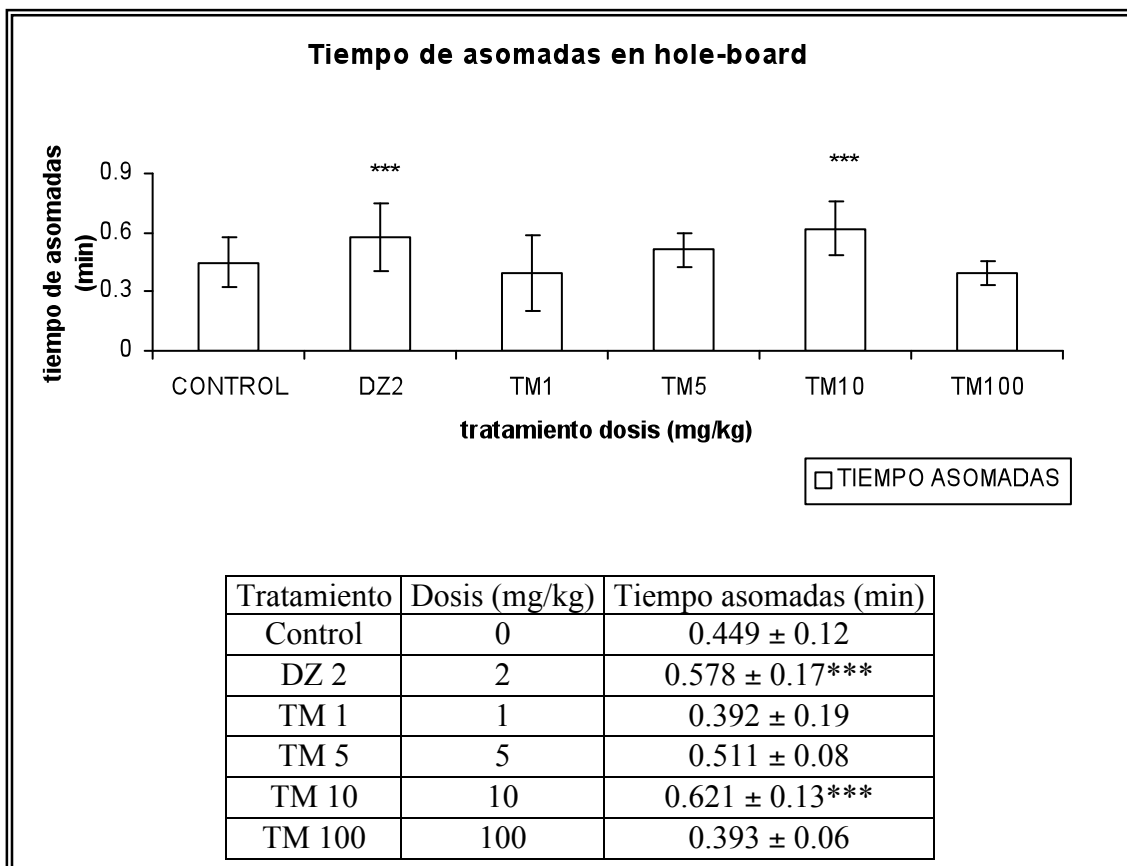


Figura 19. Evaluación del efecto ansiolítico y/o sedante de EATM en el modelo "Hole-board".
 *** diferencia estadística p < 0.001

El efecto anticonvulsivo de EATM fue evaluado en el modelo de inducción de convulsiones por PTZ. Como se observa en la Figura 20, el EATM produjo un aumento en el tiempo de latencia de crisis tónicas con respecto al grupo control para las dosis de 10, 100, y 1500 mg/kg (H = 14.5, gl = 4, P = 0.0059), también se observa un aumento en el tiempo de latencia de las mioclonias a las dosis de 1000 y 1500 mg/kg (H = 25.1, gl = 6, P = 0.0003), y el tiempo de latencia de crisis clónicas (H = 27.6, gl = 6, P = 0.0001). Sin embargo, el EATM no produjo cambios en el número de mioclonias ni tónicas tal y como se observa en la Figura 21. Estos resultados muestran que el EATM posee un efecto protector a las convulsiones inducidas por PTZ.

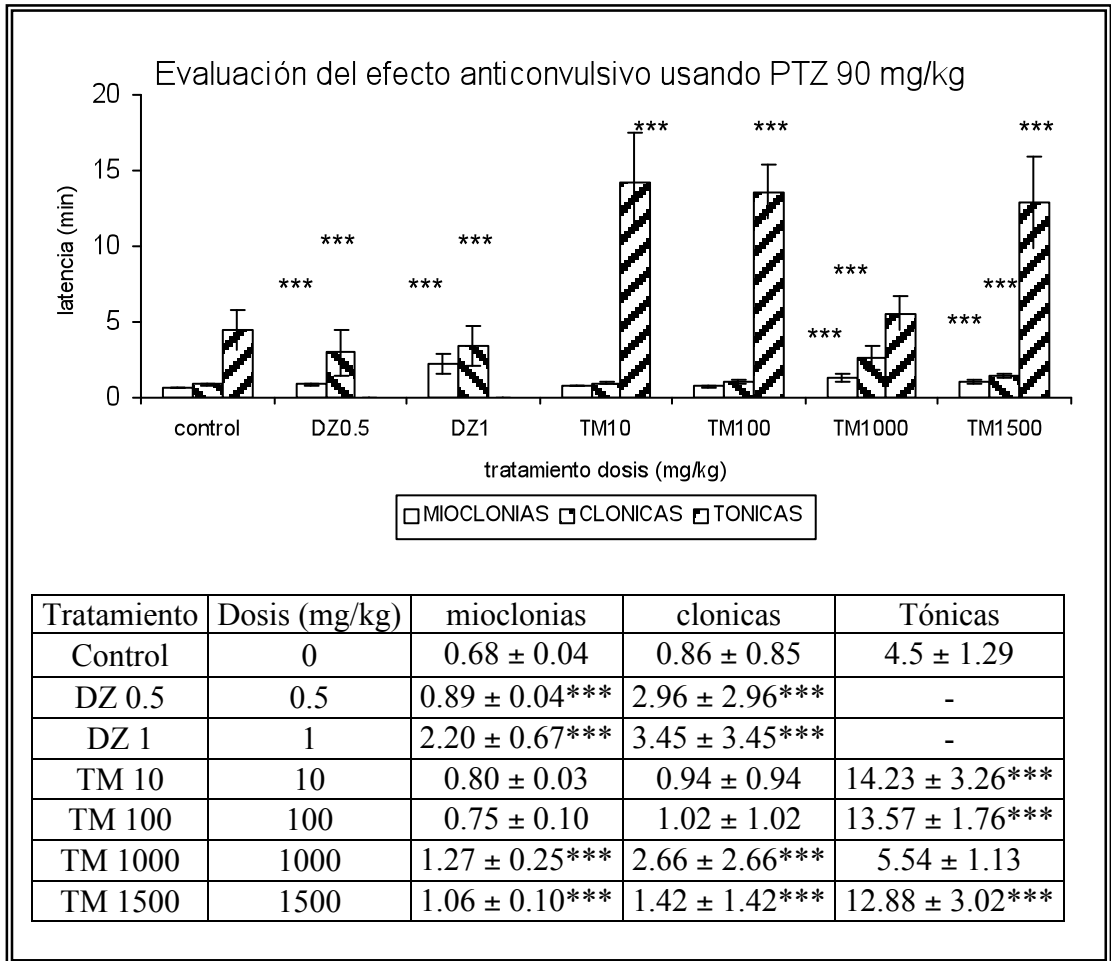


Figura 20. Evaluación del efecto anticonvulsivo de EATM en el modelo de inducción de convulsiones por PTZ 90 mg/kg.

*** diferencia estadística $p < 0.001$

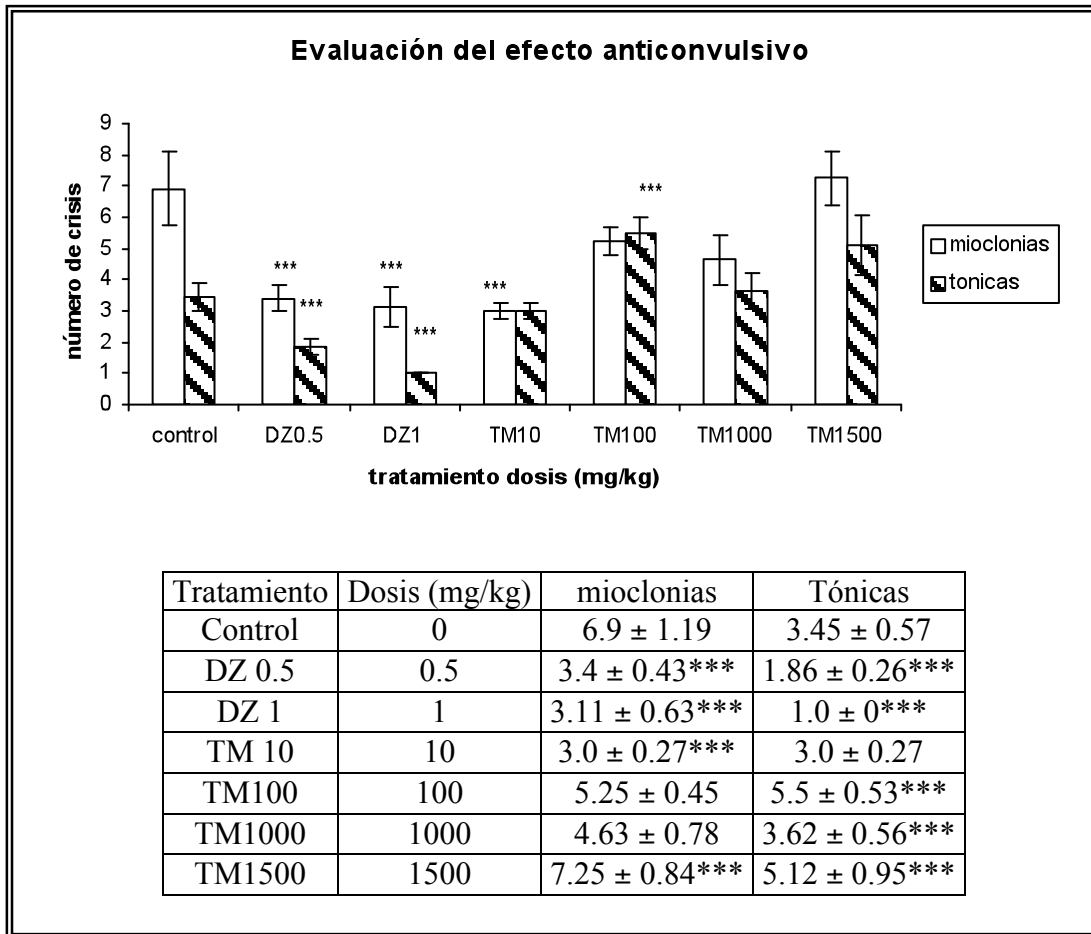


Figura 21. Evaluación del efecto anticonvulsivo de EATM en el modelo de inducción de convulsiones por PTZ 90 mg/kg.
 *** diferencia estadística $p < 0.001$

Estudio fitoquímico

Los extractos orgánicos fueron obtenidos a partir de 100 g de toronjil de monte, utilizando hexano, acetato de etilo, y metanol sucesivamente, mediante el proceso de evaporación se obtuvieron 3.65 g (3.65 %) de extracto de hexano, 8.5 g (8.5 %) de extracto de acetato de etilo y 9.6 g (9.6 %) de extracto de metanol, los cuales fueron trabajados por separado.

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (10/90) se logró aislar por recristalización, β -sitosterol, (10 mg, 0.01 %) como un sólido blanco cristalino. De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (20/80) se aisló ácido ursólico (25 mg, 0.025 %) como un sólido amorfo blanco. Ambos productos fueron identificados mediante la comparación de sus datos espectroscópicos con los descritos en la literatura.

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (40/60) se obtuvo, mediante recristalización en un sistema de AcOEt/hexano, un sólido cristalino amarillo (54 mg, 0.054 %), el cual resultó ser una mezcla de dos productos. Esta mezcla se reunió con las fracciones eluidas con hexano/ AcOEt (60/40) del extracto de AcOEt por mostrar el mismo perfil de ccf y fueron separadas mediante una columna relámpago utilizando como eluyente una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ al 0.1 %, de esta cromatografía se aislaron 15 mg (0.015 %) de un sólido cristalino amarillo con punto de fusión 270-274 °C, el cual fue identificado como **5,8-dihidroxi-6,7,4'-trimetoxiflavona**³¹, de acuerdo a sus características espectroscópicas.

En el espectro de masas obtenido por IE, se observa una señal para el ion molecular, (M^+) a m/z 344 que corresponde a una fórmula $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$ (Espectro 1).

En el espectro de RMN ^1H (Espectro 2) se observan dos señales simples anchas que intercambian con D_2O en 12.65 y 9.6 ppm, la primera se asigna al protón del hidroxilo unido al C-5, que esta formando un puente de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo en C-4, la segunda corresponde al protón de un grupo hidroxilo unido al C-8.

En la zona de protones sp^2 , se observan dos señales simétricas a 7.81 y 6.99 ppm, cada una integra para dos protones y corresponden a una sustitución aromática 1,4 correspondiente al anillo B de un sistema de tipo flavonoide, Estas señales corresponden a un sistema de acoplamiento AA'BB', característico de este tipo de productos, y se asigna a los protones H-2', H-6' y H-3', H5', también se observa una señal simple que integra para un protón en 6.6 ppm, y se asigna al protón vinílico en posición α al grupo carbonilo del anillo C (H-3), en 4.10, 3.97, y 3.94 ppm, se observan señales simples que corresponden a 3 grupos metoxilos, uno de los cuales se asigna esta unido al C-4', del anillo B, y los dos restantes unidos al C-6 y C-7, lo cual esta de acuerdo con la señal observada en el espectro de masa, correspondiente al fragmento a $m/z = 210$, producto de una fragmentación tipo Retro Diels Alders, característica de metabolitos de tipo flavona, del cual también se deduce que la posición C-3 no esta sustituida, por lo que el C-8 esta sustituido por un grupo hidroxilo. En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 3), se observa una señal a 159.1 ppm asignado al C-5, dos señales a 128.0 y 116.2ppm, la primera asignada a los C-2' y C-6', y la otra corresponde a los C-3' y 5', una señal a 103.8 ppm asignada a C-2, adicionalmente se observan tres señales a 62.1, 61.1 y 56.1 ppm correspondientes a tres grupos metoxilo. Las características espectroscópicas antes descritas están de acuerdo con las descritas en la literatura para la **5,8-dihidroxi-4', 6, 7- trimetoxiflavona**, la cual recibe el nombre trivial de **8-hidroxisalvigenina**, para indicar que esta puede provenir biogénicamente de la

hidroxilación en la posición C-8 de la salvigenina. Este producto se ha descrito en algunas especies del género *Ocimum*, *Nepeta* y *Satureja*.^{31, 32.}

De esta misma columna se aislaron 98.4 mg (0.098 %), de un sólido cristalino amarillo, con $pf=177-178$ °C identificado como la **5-hidroxi-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavona**, cuyos datos espectroscópicos se describen a continuación.³² En el espectro de masas obtenido por IE, se observa una señal para un ion molecular, M^+ a m/z 388, que corresponde a una fórmula $C_{20}H_{20}O_8$ (Espectro 4), y una señal a $m/z = 373$ (M^+-15 uma). El espectro de RMN 1H (Espectro 5) muestra un sistema de señales característico de un núcleo de flavona, en el cual se observa una señal simple que intercambia con D_2O en 12.5 ppm asignada al protón del hidroxilo unido al C-5 que se encuentra quelatado, esto es, un protón que interacciona electrostáticamente con el átomo de oxígeno del grupo carbonilo vecino (C-4), causando una disminución de densidad electrónica en el entorno del protón del hidroxilo y originando un efecto de desprotección sobre el mismo, desplazando el protón a campo bajo. Este carbono se observa como una señal a 182.9 ppm en el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 6). En la región de los protones aromáticos, se observa un sistema doble de doble que integra para dos protones y corresponden a los 6'-H ($J = 8.4, 2.1$) y 2'-H ($J = 2.1$) a 7.6 y 7.42 ppm, respectivamente; una señal doble con una constante de acoplamiento de 8.7, asignada al protón en la posición C-5', este grupo de señales corresponde a un sistema de sustitución ABX característico del anillo B de una flavona. Las posiciones C-4' y C-3' están sustituidas por dos de los cinco grupos metoxilos que se encuentran a campo bajo a 4.12, 4.00, 3.99, 3.98 y 3.97 ppm los cuales se observan como señales simples. Esta sustitución se confirma por el fragmento a $m/z = 163$ que se observa en el espectro de masas. También, se observa una señal simple a 6.6 ppm, asignada al protón en el C-3. Los tres grupos metoxilos restantes se encuentran en las posiciones

C-6, C-7 y C-8 del anillo A. Esta sustitución también está de acuerdo al fragmento a $m/z = 211$ que se observa en el espectro de masas como resultado de una fragmentación tipo Retro-Diels Alder (figura 23). Adicionalmente, en el espectro de RMN ^{13}C , se observa la señal del C-4 del grupo carbonilo a 182.9 ppm, así como, una señal a 163.9 ppm asignada al C-2. Finalmente, a campo alto se observan las cinco señales de los grupos metoxilos a 62.07, 61.72, 61.13, 56.13 y 56.02 ppm. Las características físicas y espectroscópicas están de acuerdo con las descritas en la literatura para la **5-hidroxi-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavona** o **5-desmetoxinobiletina**,³² metabolito aislado previamente de *Satureja montana*.

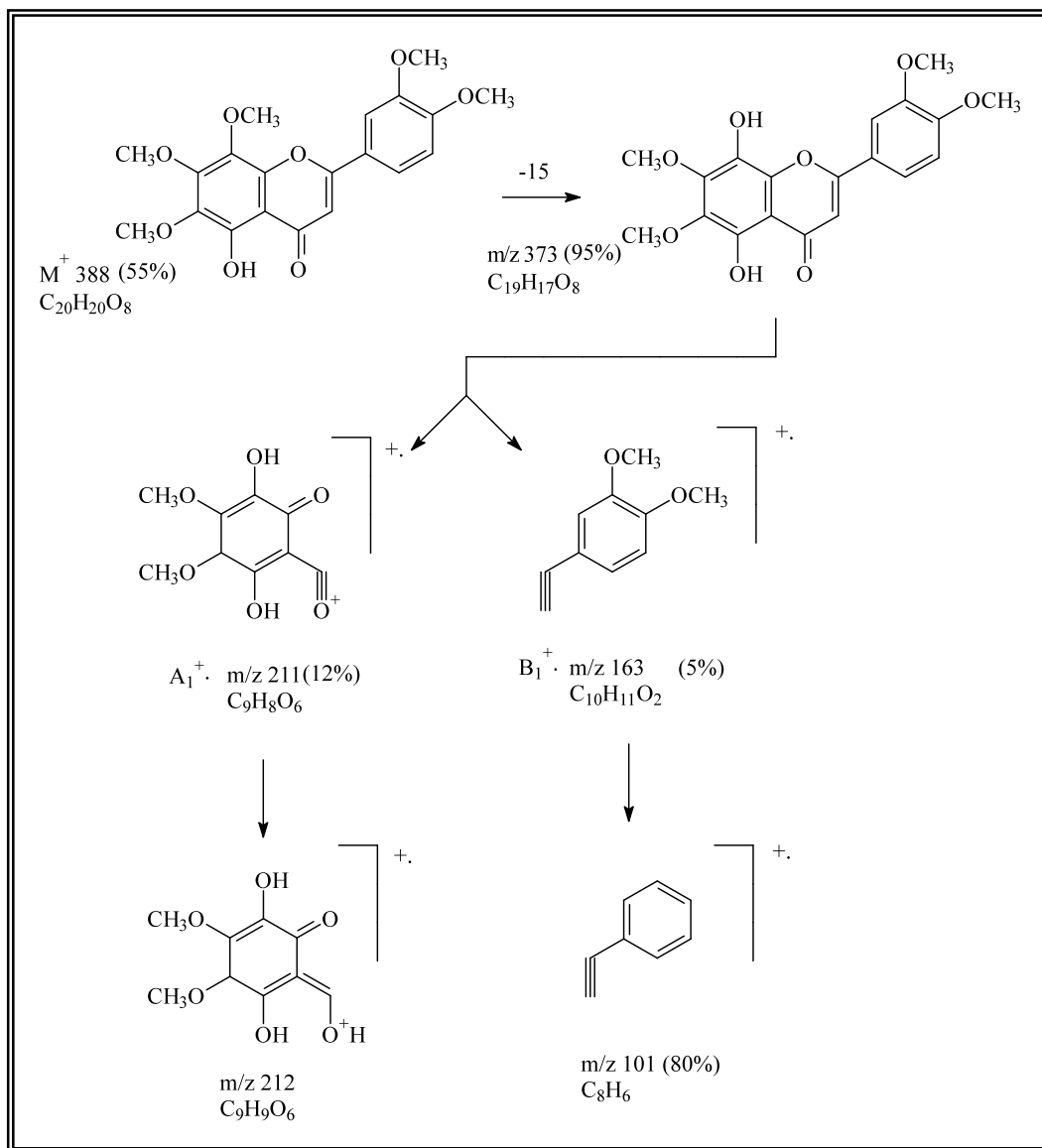


Figura 22. Patrón de Fragmentación de 5-desmetoxinobiletina

Las fracciones eluidas con AcOEt /MeOH (80/20) de la columna original, se reunieron y se separaron por medio de cromatografía de capa preparativa utilizando como medio de elución una mezcla de hexano/cloruro de metileno/metanol (20/60/20) y de la cual se aislaron 116 mg (0.116 %) de la **neoponcirina**³⁴ (5-hidroxi, 4'-metoxi-7-O-glucosil, 6''-O-ramnosil-flavanona) como un sólido blanco con $pf = 256$ °C ($pf = 210-212$ °C descrito); cuyas propiedades espectroscópicas se describen a continuación.

Se observa una señal a $m/z = 286$ (34 %) que corresponde a la aglicona $C_{16}H_{14}O_5$, como producto de la pérdida de las entidades de glucosa y ramnosa y una señal en $m/z = 256$ (38%) producto de la pérdida del metoxilo en el C-4' (Espectro 7).

En el espectro de RMN 1H (Espectro 8), se observa una señal simple que intercambia con D_2O en 12.01 ppm, asignada al protón del hidroxilo unido al C-5 que se encuentra quelado con el carbonilo del carbono en a posición 4.

En la zona de protones aromáticos, se observan dos señales simétricas a 7.46 y 6.97 ppm cada una integra para dos protones y corresponden a una sustitución aromática 1,4 característica del anillo B de un sistema de tipo flavonoide, y se asigna a los protones H-2', H-6' y H-3', H5', la posición 4' esta sustituida por un grupo metoxilo que se observa como una señal simple a 3.76 ppm, también se observa una señal simple que integra para dos protones en 6.12 ppm, y se asigna a los protones en el carbono 6 y carbono 8.

En 5.56 ppm se observa una señal en forma de doble de doble con $J = 12, 3$ Hz que integra para un protón y se asigna al H en C-2, este sistema esta acoplado a la señal en 3.15 ppm y a la señal en forma de doble de doble en 2.77 ppm ($J=17.6, 3$ Hz), ésta interacción es confirmada por la correlación observada para este conjunto de señales en el espectro de COSY (Espectro 9). Mientras que, en el espectro de HETCOR los C-2 y C-3 se observan a 78 y 41.8 ppm respectivamente. (Espectro 10).

En 4.96 ppm se observa una señal doble con $J = 7.2$ Hz, asignada al protón anomérico de un fragmento de glucosa, acoplada con una señal a 3.4 ppm, que se sobrepone con las señales del disolvente, el desplazamiento de éste protón anomérico es característico de un glicósido de flavonoide en la posición 7. En 4.50 ppm se observa una señal doble con $J = 7$ Hz, asignada al protón anomérico de una ramnosa, a 1.07 ppm se observa una señal doble que integra para tres protones que corresponde al grupo metilo de

la ramnosa. En el espectro de RMN ^{13}C , se observan las señales correspondientes al grupo carbonilo de C-4 a 196.99 ppm, a 165.1 la señal que corresponde a C-5, a 128.4 ppm que se asigna a C-2' y C-6,' a 113.87 ppm se observan las señales que corresponden a C-3' y C-5', mientras que las señales de los carbono anoméricos de glucosa y ramnosa se asignan a las señales en 100.5 y 103.2 ppm respectivamente, finalmente la señal del grupo metilo de ramnosa se observa a 17.76 ppm.

Las fracciones eluidas con AcOEt /metanol (80/20) se reunieron y se separaron por medio de cromatografía de capa preparativa, utilizando, como medio de elusión una mezcla de hexano/cloruro de metileno/metanol (20/60/20), de la cual se aislaron (10 mg, 0.01 %) de **hesperidina**,³⁵ como un sólido blanco cuyo punto de fusión fue superior a los 280 °C.

En el espectro de masas obtenido por IE (Espectro 12), no se observa la señal para el ion molecular 610 [M^+] ($\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$), sin embargo se observa una señal a $m/z = 286$ (80 %) que corresponde a la pérdida de las entidades de glucosa y ramnosa, así como a la pérdida del hidroxilo en la posición C-3'. Se observa un fragmento en $m/z = 134$ (100 %) del cual se deduce que tiene un grupo metoxilo en la posición C-4' como resultado de una fragmentación de tipo retro Diels Alder, la señal en 55.1 ppm del espectro de RMN ^{13}C ayuda a confirmar la presencia del grupo metoxilo.

En el espectro de RMN ^1H se observa en la región de los protones aromáticos, una señal doble de doble con un desplazamiento de 7.45 ppm que integra para dos protones asignados a H-6' ($J = 9$ Hz) y H-2' ($J = 2.4$ Hz), una señal en 6.97 ppm asignada al protón en la posición C-5 ($J = 7.8$ Hz). Este grupo de señales corresponde a un sistema de sustitución ABX característico del anillo B de una flavona. A 6.1 ppm se observa una señal simple que

integra para dos protones que corresponden a H-6 y H-8. En 5.56 ppm se observa una señal con multiplicidad doble de triple con $J = 12.6, 3.3$ que se asigna al protón H-2, se observa una señal múltiple en 4.96 ppm que integra para un protón con una constante de acoplamiento de 7.2 asignada al protón anomérico de la glucosa, una señal simple ancha en 4.51 ppm que corresponde al protón anomérico de la ramnosa, en 2.78 ppm se observa una señal múltiple con $J = 18.3, 3.3$ Hz que de acuerdo a su desplazamiento se asigna al protón en C-3 con orientación ecuatorial, mientras que la señal correspondiente al protón axial se sobrepone con las señales del disolvente. Finalmente, a 1.09 ppm se observa la señal correspondiente al grupo metilo de la ramnosa en forma de doble de doble con una constante de acoplamiento de 6.3 y 1.5 Hz.

En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 14), se observa una señal a 196.85 que corresponde al grupo carbonilo en la posición C-4, las señal en 165.02 ppm asignada a C-5, mientras que las señales que corresponden a los a C-2 y C-3 se observan a 78.19 y 41.86 ppm respectivamente, de forma similar a lo observado para neoponcirina los carbonos anoméricos de glucosa y ramnosa se observan de 100.5 y 103.2 ppm mientras que el C-3' ahora se observa a 162.99 ppm. Finalmente, los carbonos base de oxígeno correspondiente a la glucosa y ramnosa se observan en la región de 76.22 a 68.22 ppm, el $-\text{OCH}_3$ en posición C-4' se observa a 55.12 ppm y el metilo de la ramnosa en 17.72 ppm.

Las propiedades químicas y farmacológicas de la hesperidina han sido ampliamente estudiadas, de tal forma que se ha sido descrita su actividad antiinflamatoria, antihipertensiva, diurética, como constrictor capilar, antioxidante, y ansiolítica. Así mismo, se encuentra disponible comercialmente como componente de suplementos alimenticios.

De la misma columna se detectó la presencia de naringenina por comparación de su perfil en ccf con una muestra auténtica desafortunadamente la cantidad no fue suficiente para realizar la espectroscopía del compuesto.

Finalmente, en un estudio paralelo realizado por nuestro grupo de trabajo, se analizó mediante la técnica de CLAR, el extracto acuoso que fue evaluado farmacológicamente. En este análisis, se detectó la presencia de 11 metabolitos de tipo flavonoide, de los cuales hasta el momento se ha identificado a la hesperidina, como el componente mayoritario del extracto y la 5-desmetoxinobiletina también fue identificada.

Es importante mencionar que ha sido descrito previamente el efecto analgésico y sedante de hesperidina, lo que hace pensar que este metabolito contribuye de forma importante a las propiedades observadas por el extracto acuoso de *Satureja mexicana*.

6. CONCLUSIONES

El extracto acuoso de *Satureja mexicana* inhibe las respuestas específicas evocadas por un estímulo térmico, es decir, posee un efecto antinociceptivo. Ejerce un efecto sedante en los animales de prueba y posee un efecto protector ante las convulsiones inducidas por una dosis letal de PTZ. Sin embargo, no se observaron efectos ansiolíticos en los sujetos experimentales a las dosis probadas.

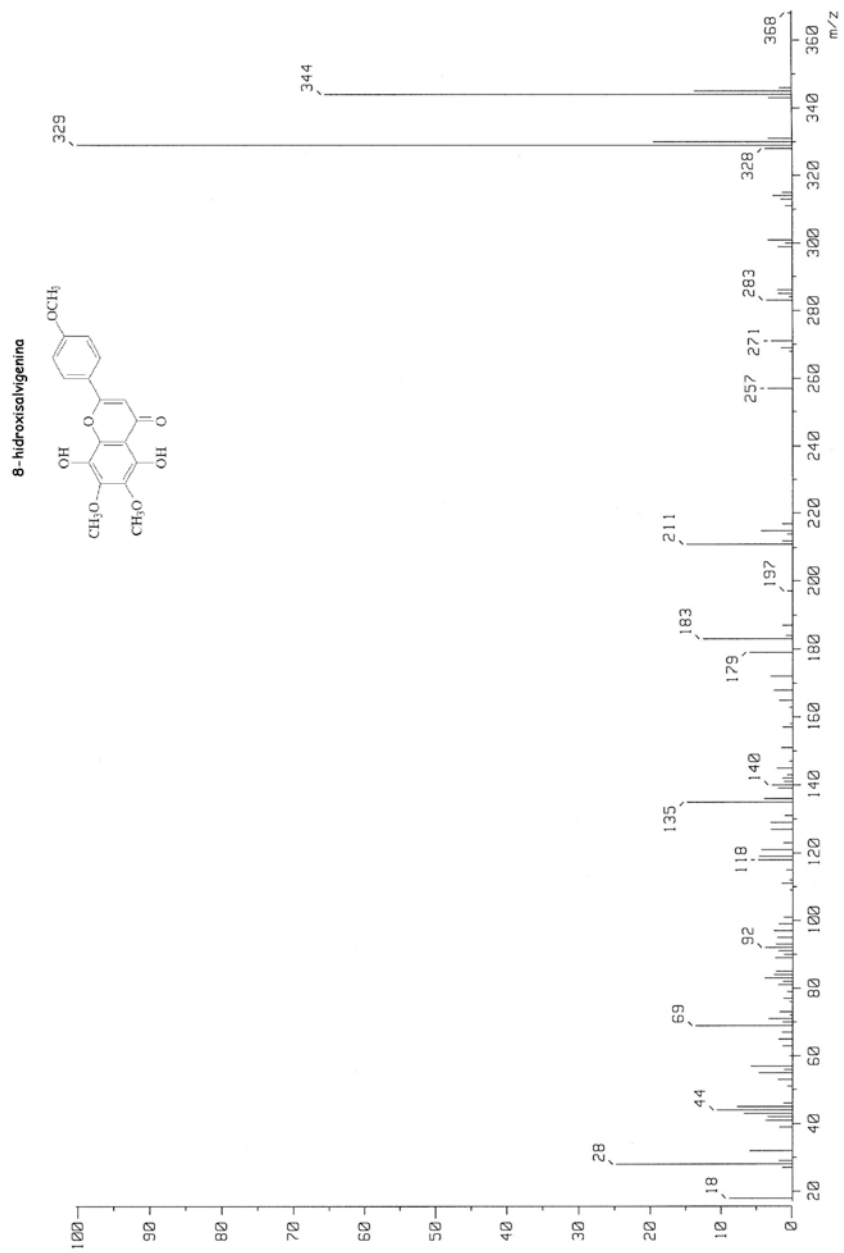
En la evaluación preliminar de la toxicidad aguda, la DL_{50} fue 2156 mg/kg, aún más, el tratamiento agudo con extracto acuoso de *Satureja mexicana* no produce efectos tóxicos significativos en los animales de prueba.

El estudio fitoquímico permitió el aislamiento e identificación estructural de 5 metabolitos de tipo flavonoide: **8-hidroxisalvigenina**, **5-desmetoxinobiletina**, **neoponcirina**, **naringenina**, y **hesperidina**, también se aislaron **β -sitosterol**, y **ácido ursólico**.

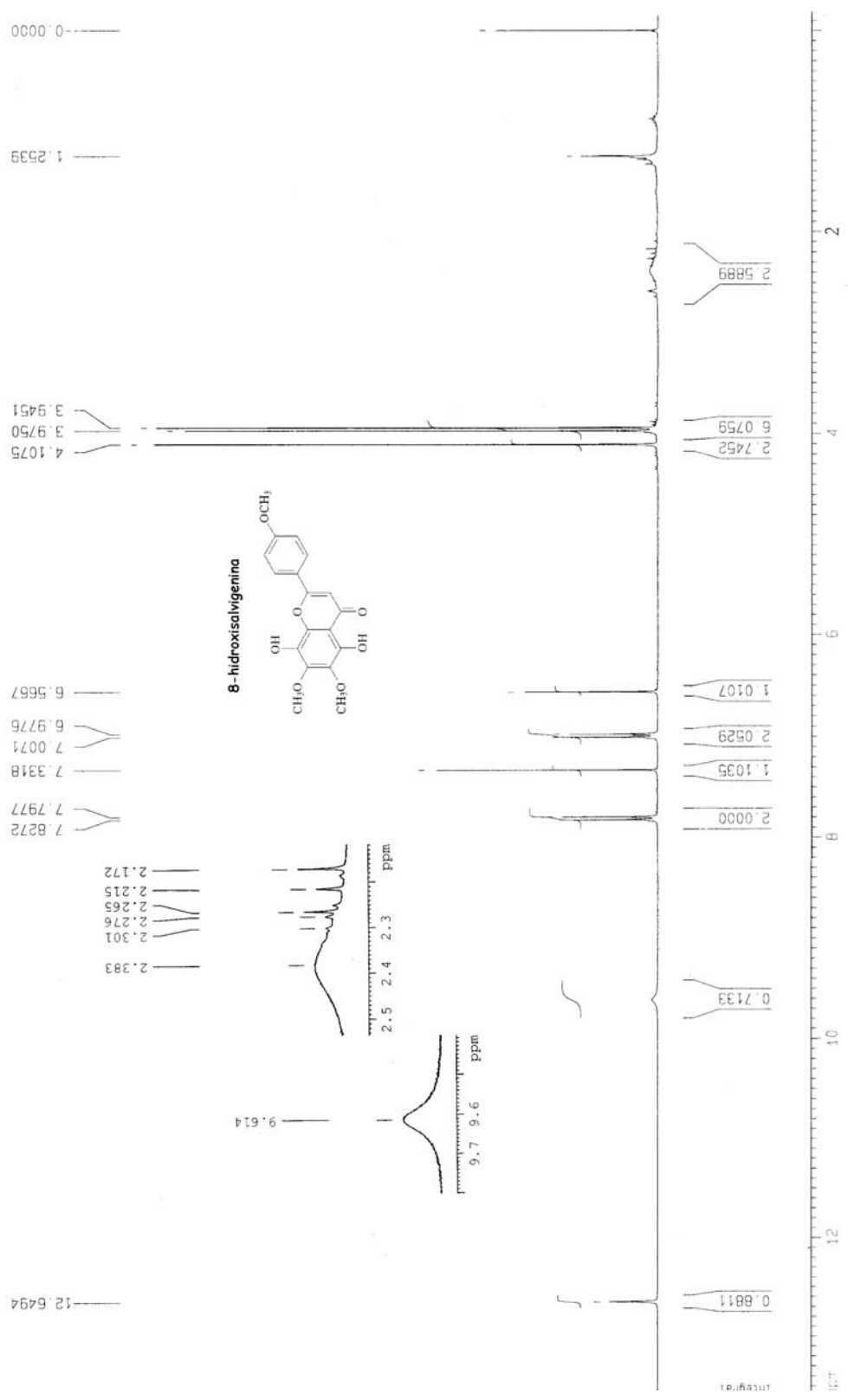
Sin duda, los efectos antinociceptivo y sedante del extracto acuoso de *Satureja mexicana* se deben principalmente a la presencia de los metabolitos de tipo flavonoide. Sin embargo, es necesario realizar estudios para caracterizar los efectos biológicos los productos aislados.

El presente estudio, contribuye al conocimiento químico y biológico de *Satureja mexicana* y demuestra su potencial como fuente de compuestos bioactivos.

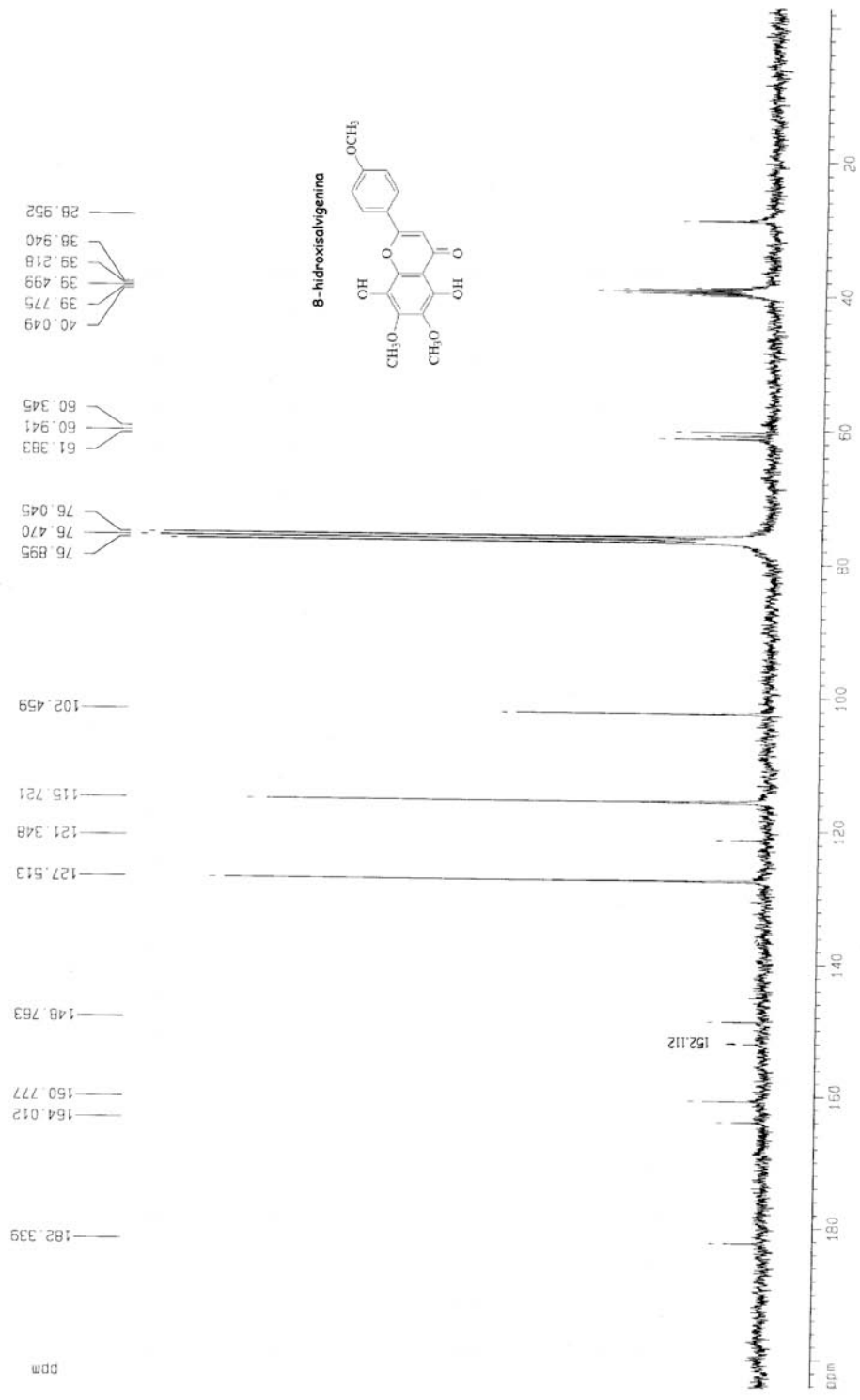
8. ESPECTROS.



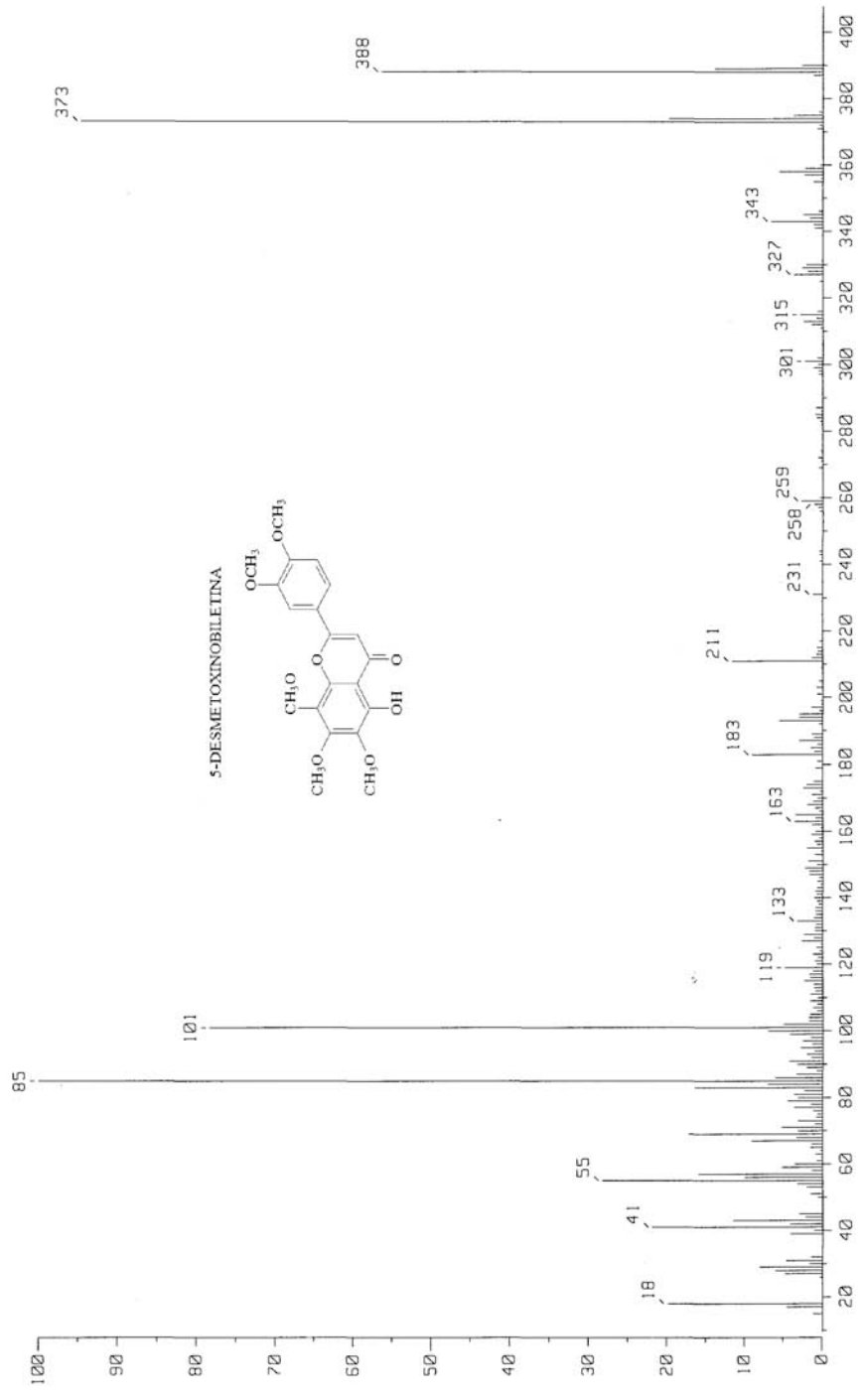
Espectro 1



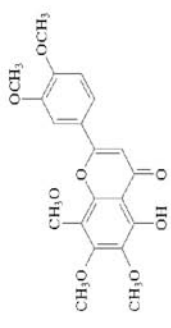
Espectro 2



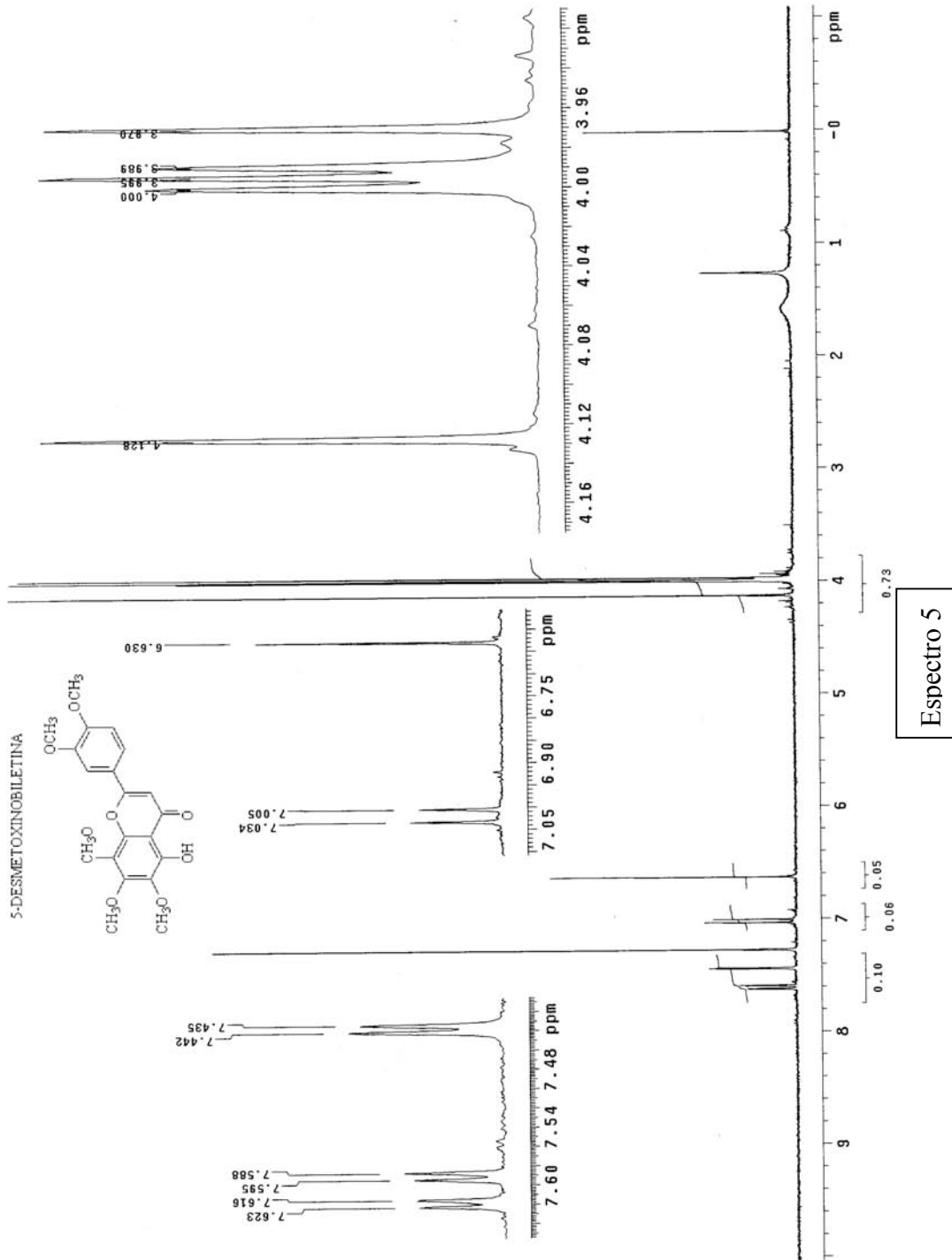
Espectro 3



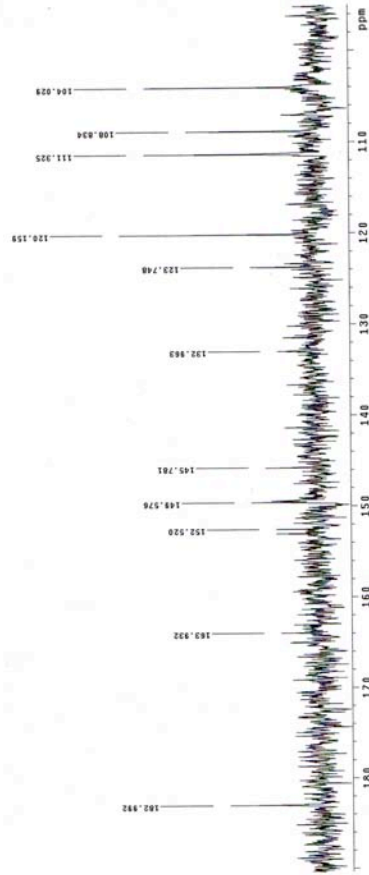
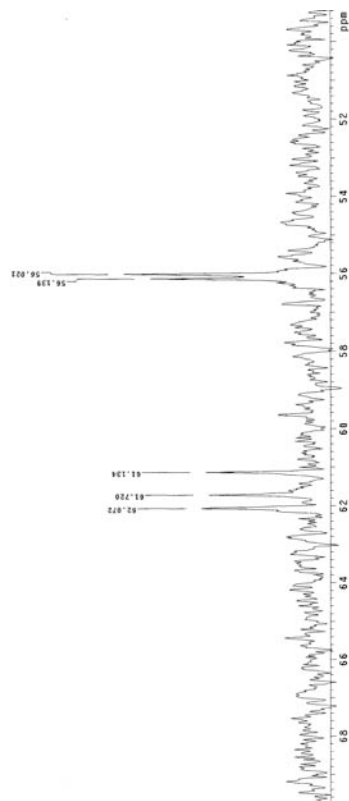
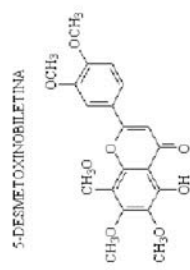
5-DESMETOXINOBILETINA



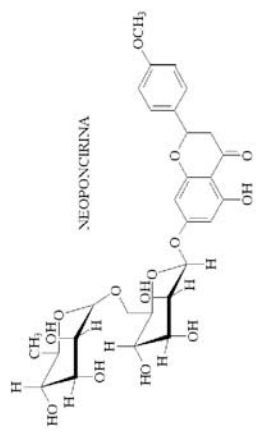
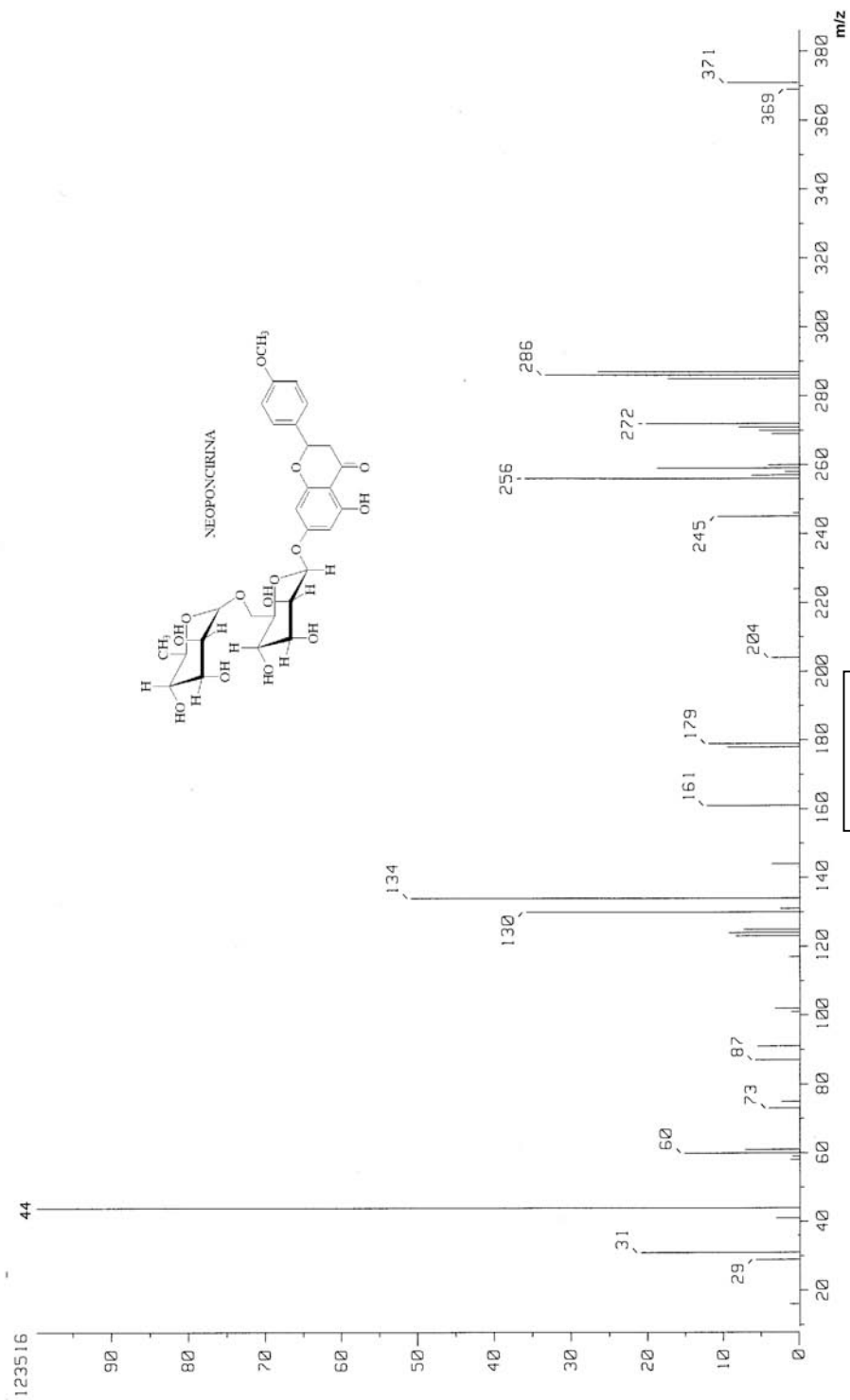
Espectro 4



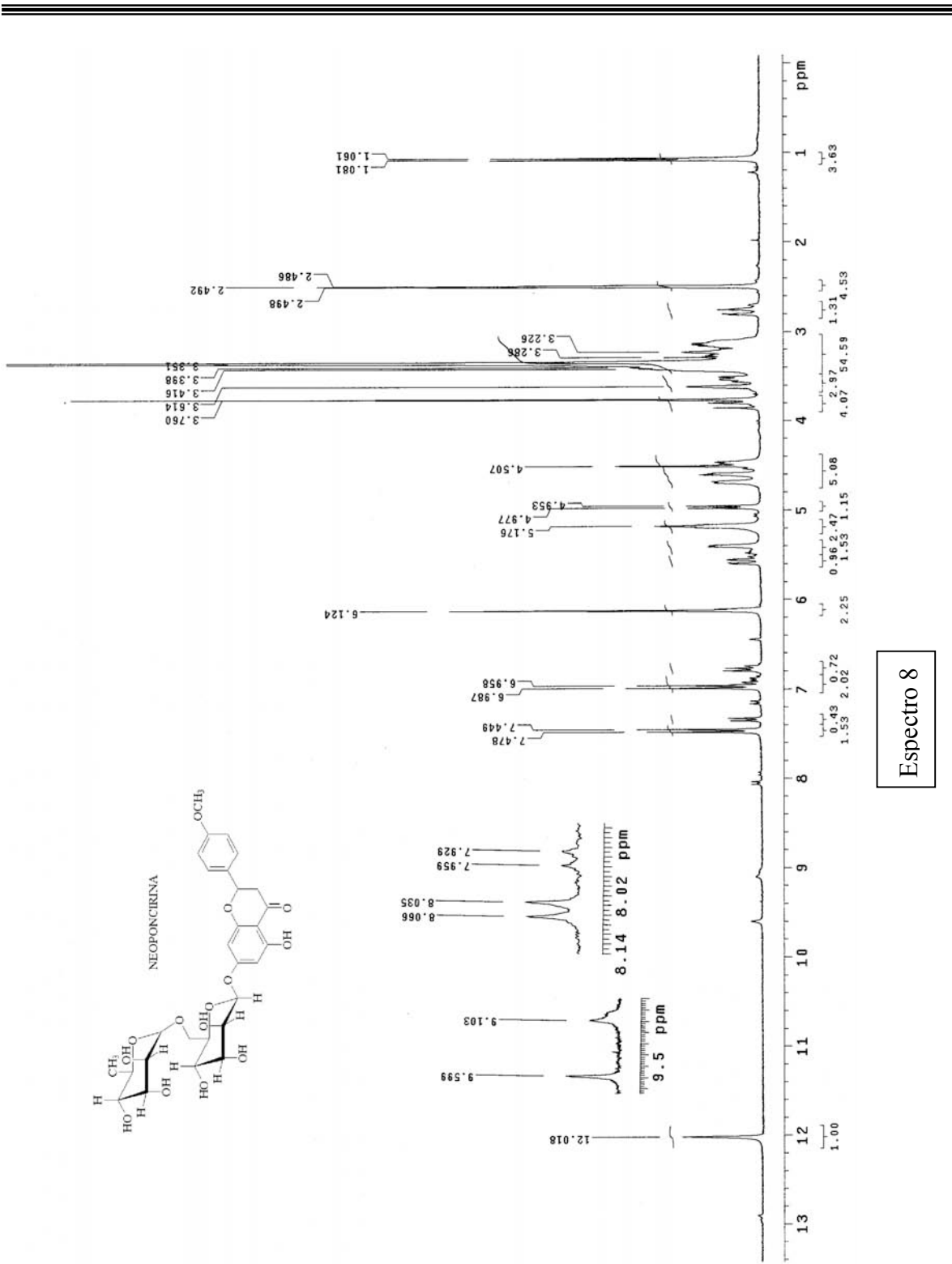
Espectro 5



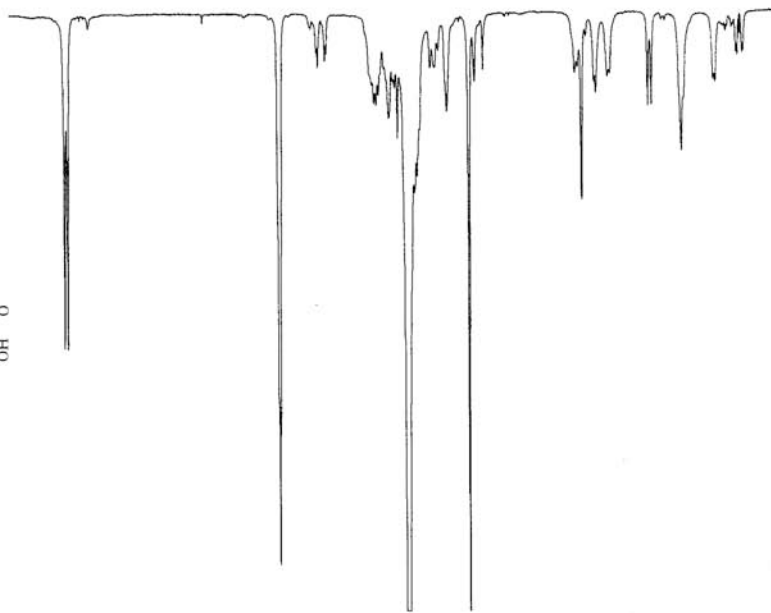
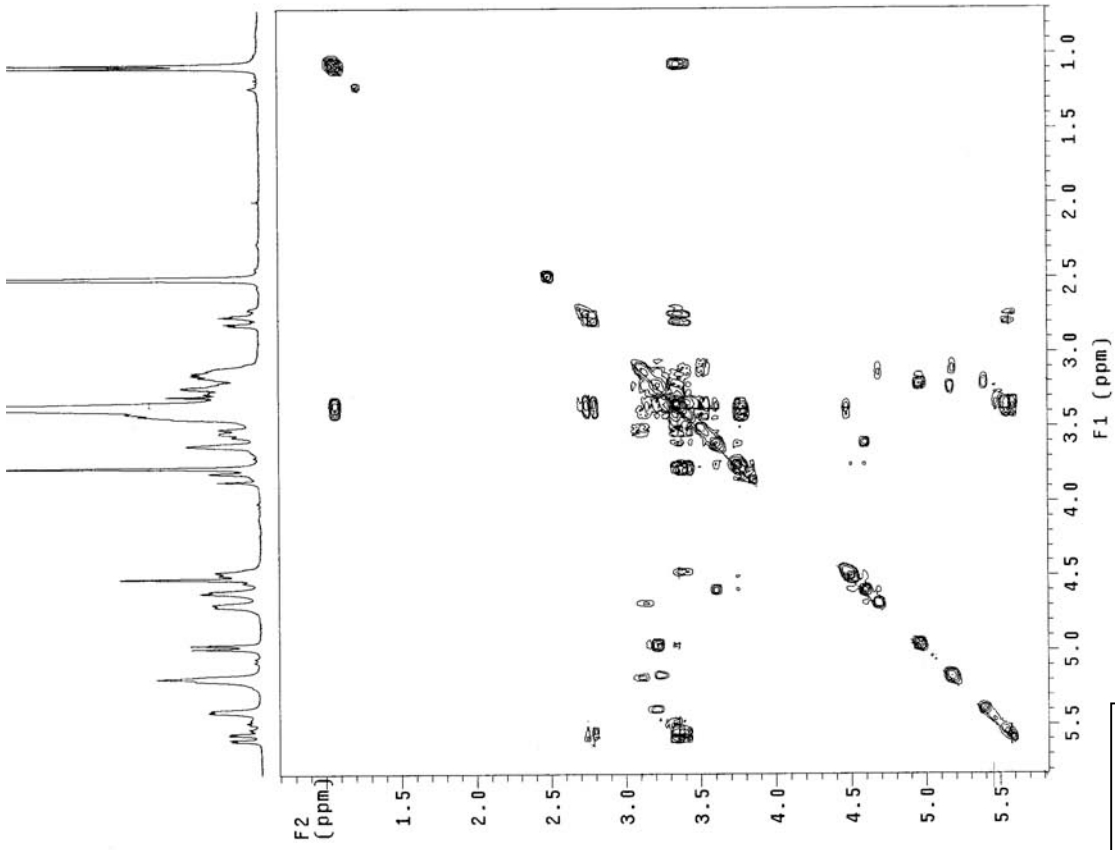
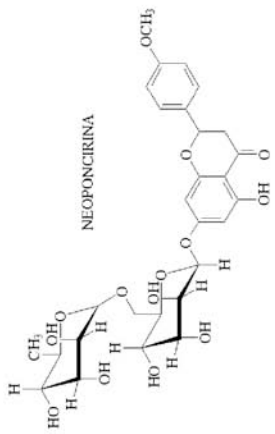
Espectro 6



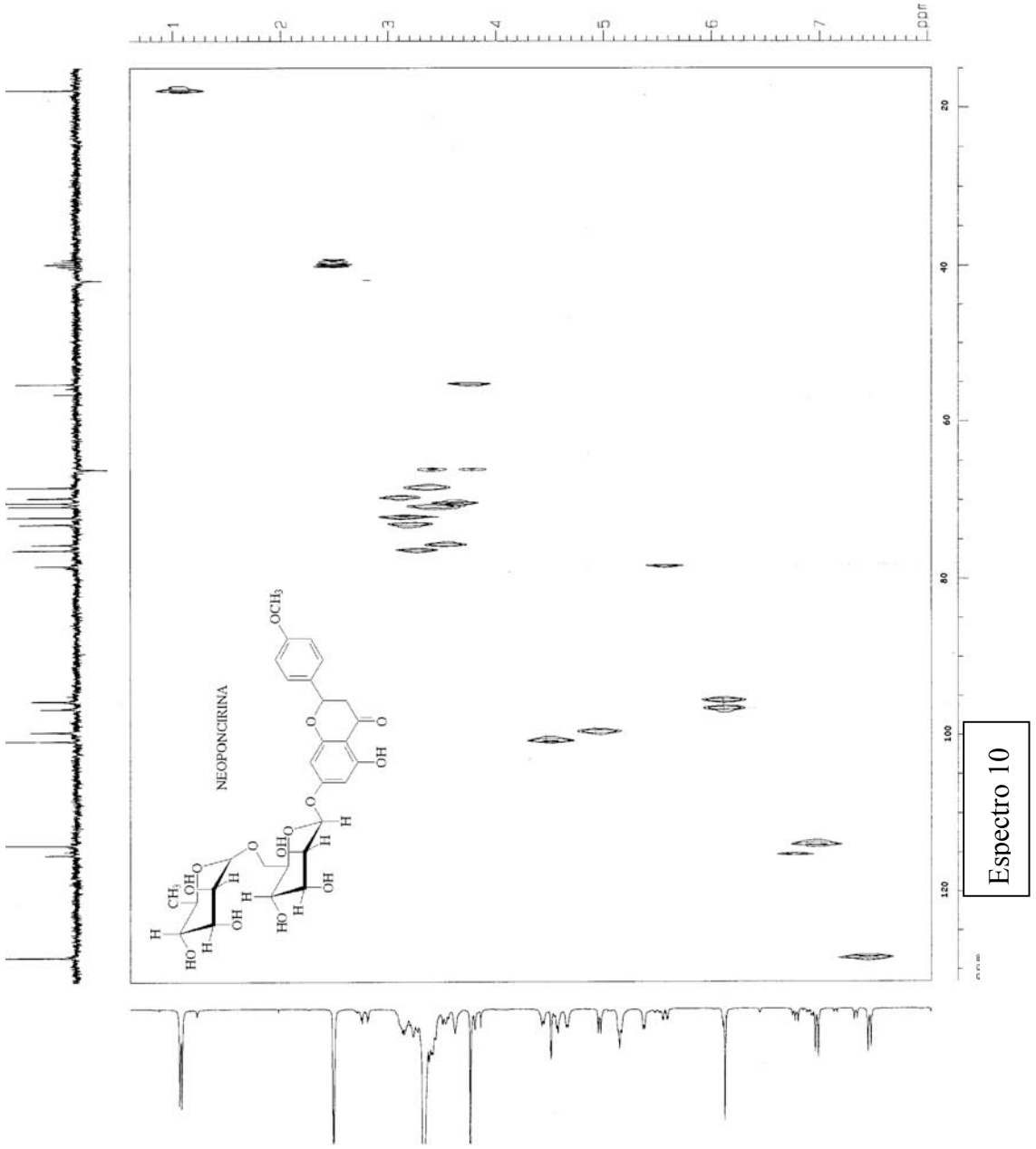
Espectro 7

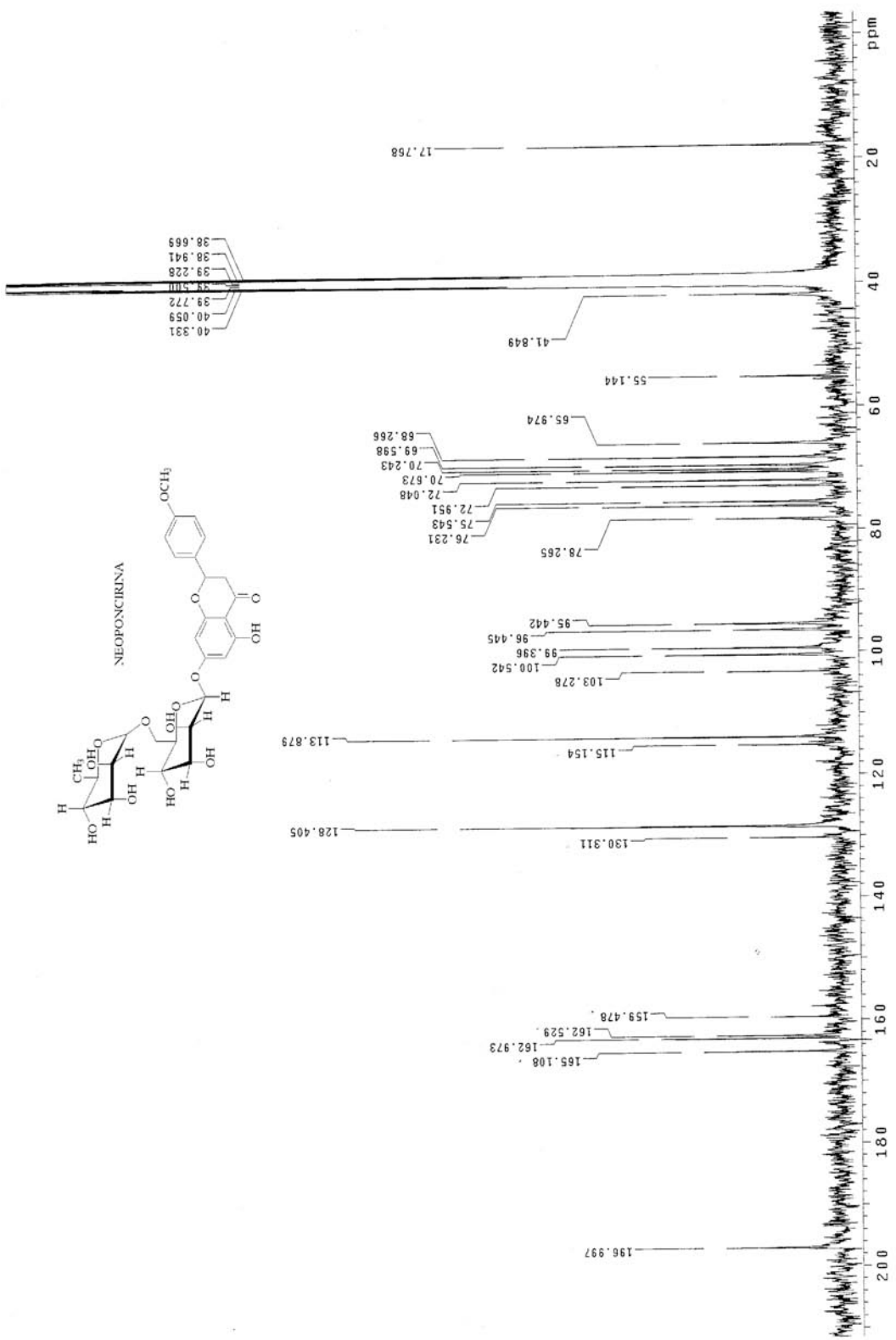


Espectro 8

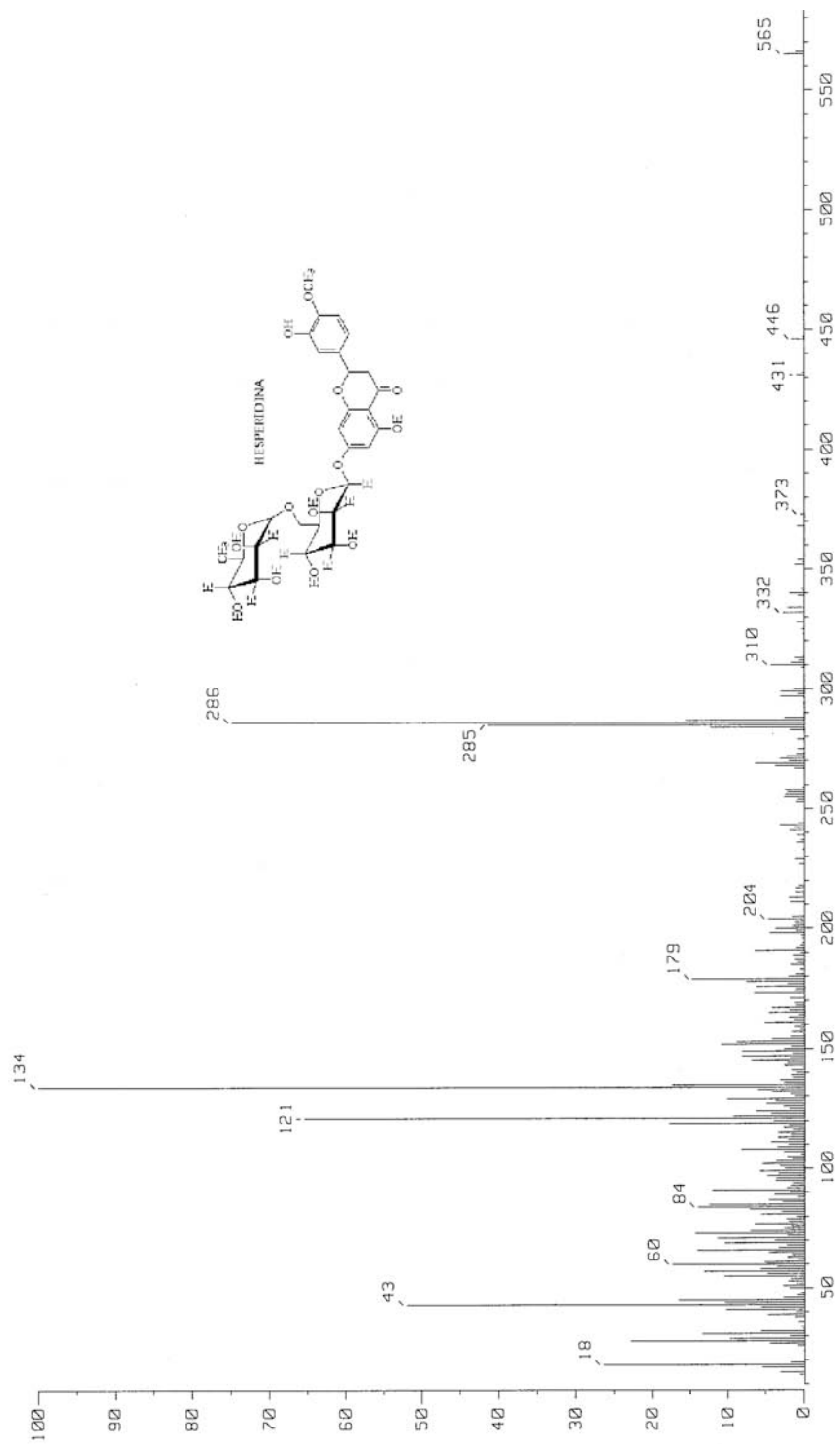


Espectro 9



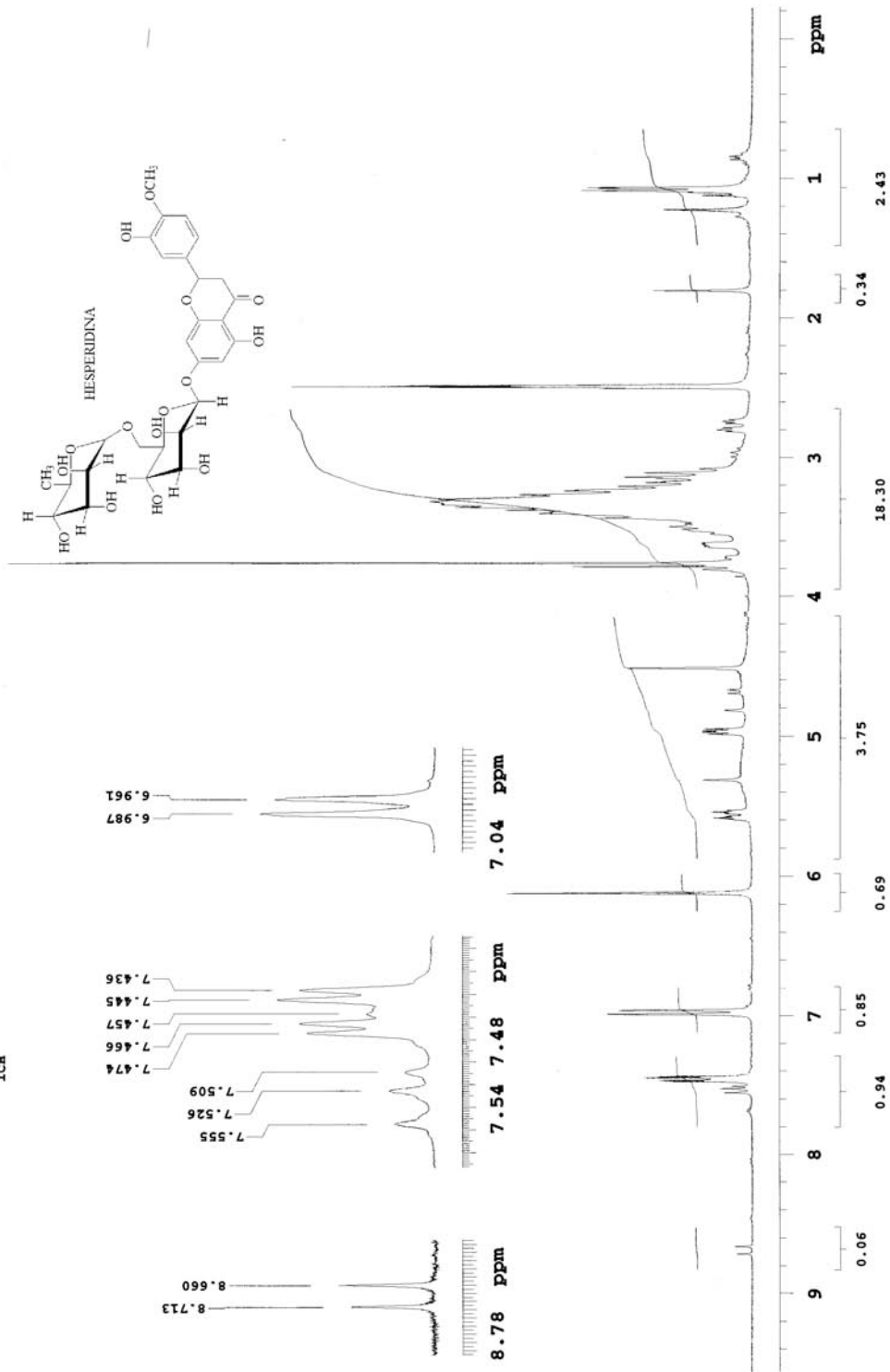


Espectro 11

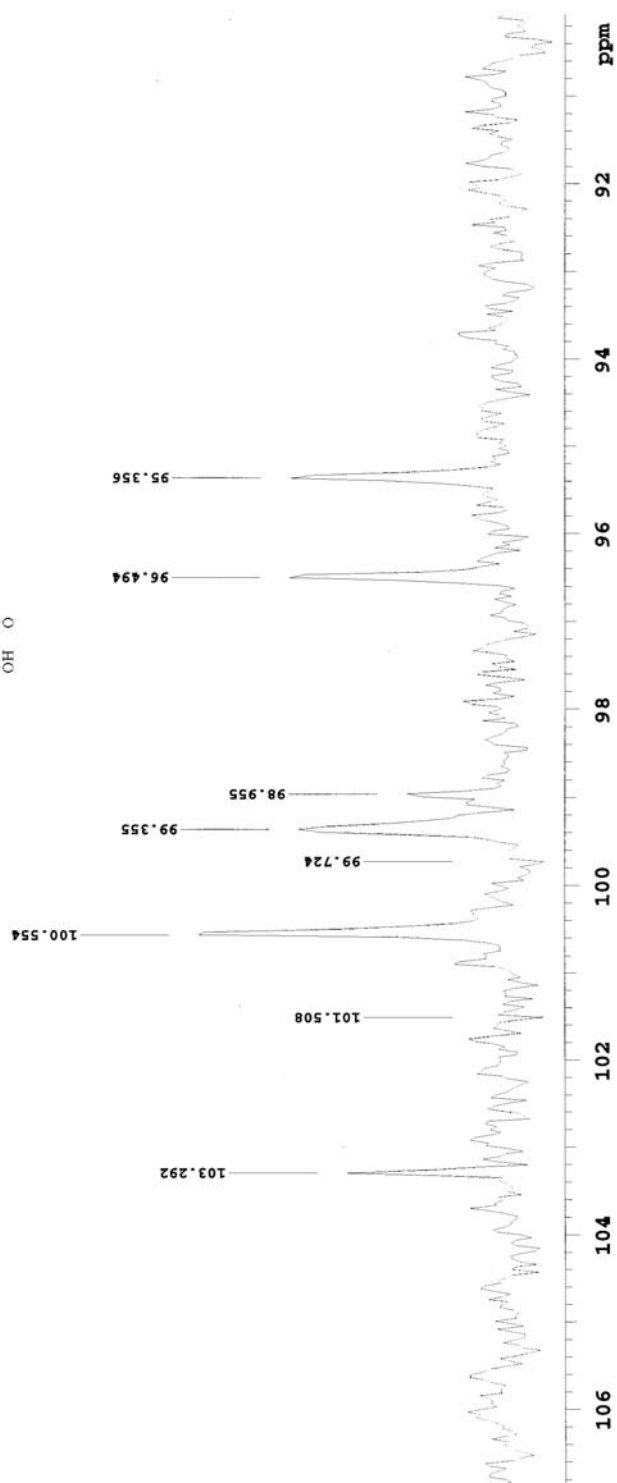
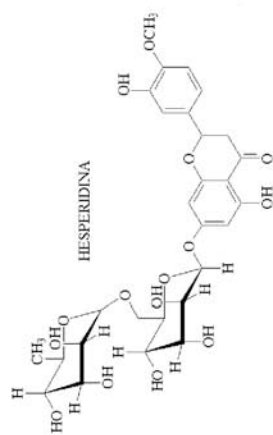


Espectro 12

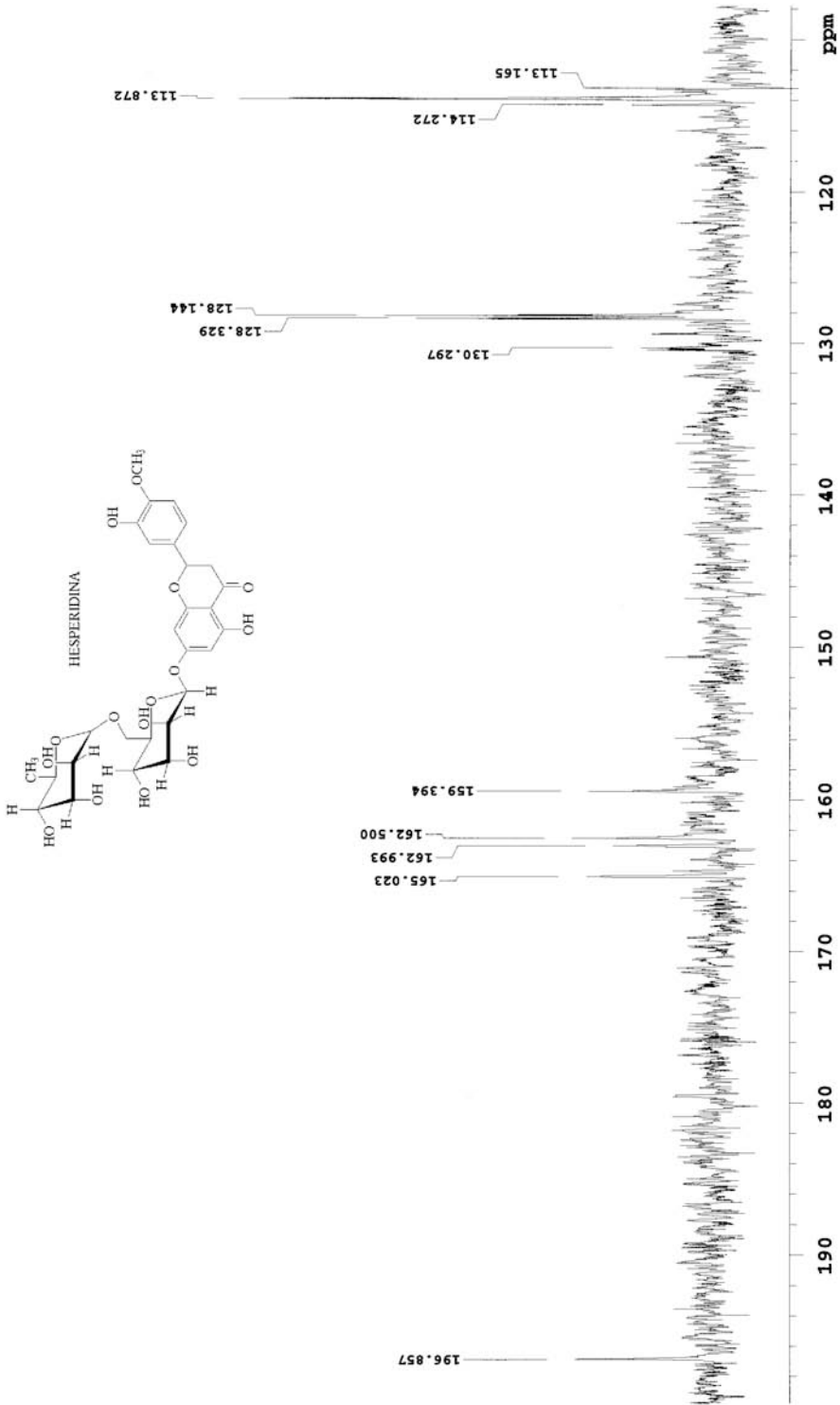
ICH



Espectro 13



Espectro 14



Espectro 15

8. BIBLIOGRAFÍA

40

- ¹ Heriberto García Rivas. Medicinal plantas, Editorial Posada, México, DF 2000.
- ² Gerardo Heinze, La ansiedad: cómo se la concibe actualmente. Ciencia. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias. Vol. 54, núm. 2, (2003), Págs. 8-15
- ³ Griez, Anxiety disorders. An Introduction to Clinical Management and Research. John Wiley and sons Ltd, UK 2001.
- ⁴ Miguel Pérez de la Mora, Dónde y cómo se produce la ansiedad: Sus bases biológicas. Ciencia. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias. Vol. 54, núm. 2, (2003), Págs. 16-28
- ⁵ E. Ernst, Herbal remedies for anxiety- a systematic review of controlled clinical trials. Phytomedicine 13 (2006) 205-208.
- ⁶ Alfredo Feria-Velasco, Sandra Orozco-Suárez, La epilepsia: cómo conocerla para tratarla mejor. Ciencia. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias. Vol. 56, núm. 3. (2005), Págs. 14-24.
- ⁷ Luisa L. Rocha, La enfermedad que alguna vez fue sagrada. Ciencia. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias. Vol. 56, núm. 3. (2005), Págs. 4-13.
- ⁸ Robert S. Fisher. Animal Models of the Epilepsies. Brain Research Reviews, 14 (1989) 245-278
- ⁹ Valiollah Hajhashemi, Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Satureja hortensis* L. Journal of Ethnopharmacology 82 (2002) 83-87.
- ¹⁰ Drill, Farmacología Médica. (1973). Editorial Fournier.
- ¹¹ www.ached.cl/db_images/revistas/43a966dc5270f_03_neurofisiologia_dolor.pdf-, consultada el 07/09/07 a las 13:30
- ¹² Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, ed 49. 2003
- ¹³ Ümit Kazim Özdoğan, Influence of Prazosin and clonidone on morphine analgesia, tolerance and withdrawal in mice. European Journal of Pharmacology 460 (2003) 127-134.
- ¹⁴ Maria P. Kotsos, A new flavonoid diglycoside and triterpenoids from *Stachys spinosa* L. (Lamiaceae). Biochemical systematics and ecology 35 (2007) 381-385.
- ¹⁵ Tomás-Barberán. Labiateae flavonoids: chemical, chemotaxonomical, economical and ecological aspects. Revista Latinoamericana de Química (1990) 21, 134-139.
- ¹⁶ Diaz R, Quevedo-Sarmiento. Phytochemical and antibacterial screening of some species of Spanish lamiaceae. Fitoterapia (1988), 59, 329-332.
- ¹⁷ Lydia Rodríguez-Hahn and Jorge Cárdenas, Comparative chemotaxonomy in Labiateae. Current topics in Phytochemistry. Vol. 2, (1999).
- ¹⁸ Mirjana Skocibusic, Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja Subspicata* Vis. Growing in Croatia. Food chemistry 96 (2006) 20-28.
- ¹⁹ Melpomeni Skoula, Surface flavonoids in *Satureja thymbra* and *Satureja spinosa* (Lamiaceae). Biochemical systematics and ecology 33 (2005) 541-544.
- ²⁰ Dewick, Medicinal Natural Products. 605 trird avenue, New York. 10158-0012, USA. (135-142)
- ²¹ Tomás-Barberán. Labiateae flavonoids: Chemical chemotaxonomical, economical and ecological aspects. Revista Latinoamericana de Química. (1990) 21, 134-139.
- ²² Harbone, Methods in plant biochemistry. Academic press (1989)
- ²³ Sebastián P. Fernández, Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam. European Journal of Pharmacology 512 (2005) 189-198.
- ²⁴ Ampai Panthong, Analgesic, anti-inflammatory and venotonic effects of *Cissus quadrangulais* Linn. Journal of Ethnopharmacology 110 (2007) 264-270.
- ²⁵ Dietrich Lorke, A new approach to practical acute toxicity testing. Archieves of Toxicology (1983) 54: 275-287

-
-
- ²⁶ C. López-Rubalcava, Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimolia* two anxiety paradigms: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Sciences* 78 (2006) 730-737.
- ²⁷ Robert S. Fisher, Animal models of the epilepsies. *Brain research reviews*, 14 (1989) 245-278.
- ²⁸ Silvia Lorenia cruz, Toluene increases acute thermociception in mice. *Behavioural Brain Research* 120 (2001) 213-220.
- ²⁹ Cathy Fernández, The effect of treatment regimen on the development of tolerance to the sedative and anxiolytic effects of diazepam. *Psychopharmacology*
- ³⁰ Rosa Estrada, Comparative chemical composition of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*. *Biochemical Systematics and Ecology* 32 (2004) 685-694
- ³¹ Matloubi F. Chemical Constituents of Dichloromethane Extract of Cultivated *Satureja Khuzistanica*. *Advance acces Publication* (2006).
- ³² Still. S. H, *Journal of Organic Chemistry*, 43, 2923(1978).
- ³³ Horie, Síntesis of 5,8-dihidroxí-6,7-dimetoxiflavones and revised structures for some natural flavones. *Phytochemistry Vol. 39, No. 5,(1995) 1201-1210.*
- ³⁴ Roberto F. Vieira. Chemical Profiling of *Ocimum Americanum* Using external Flavonoids. *Phytochemistry Vol. 63, (2003) 555-567.*
- ³⁵ Venturella Pietro. Isolation of 5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone (nobiletine) from *Citrus deliciosa* Tenore.
- ³⁶ Bellino A. Ventura. *Fitoterapia Vol. 51. (1980), 163-165*
- ³⁷ Da-yong Zhou, Identification of O-diglycosyl flavanones in *Fructus aurantii* by liquid chromatography with electrospray ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 42 (2006) 441-448.
- ³⁸ Merck Index.
- ³⁹ Crawley, J. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepinas. *Pharmacology Biochem Behav.* 15, 695. (1981)