



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS QUÍMICAS**

**EVALUACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS
PRINCIPIOS ACTIVOS SEDANTES DE
*Citrus sinensis.***

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. SILVIA LAURA GUZMÁN GUTIÉRREZ



TUTOR: DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO 2009



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	Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo
Vocal	Dra. Rachel Mata Essayag
Vocal	Dr. Mariano Martínez Vázquez
Vocal	Dr. Samuel Enoch Estrada Soto
Secretario	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

Sitio de realización de la tesis:

Laboratorio 126 del departamento de Farmacia
Facultad de Química, UNAM.

Sustentante:

M. en C. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez

Tutor:

Dr. Andrés Navarrete Castro

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca otorgada con registro 200933 para la realización de mis estudios de doctorado.

Al **Dr. Andrés Navarrete Castro** por la dirección de este proyecto y la dedicación a mi formación como investigadora.

A los miembros del **Comité Tutelar**, la Dra. María Eva González Trujado y el Dr. Alfonso Romo De Vivar Romo, por su valiosa contribución al desarrollo de este proyecto.

Al Jurado Asignado por la revisión de la presente tesis.

A la Q.F.B. Mónica Villagómez Vela y a la Q.F.B Marisol Alfaro Ramírez por su apoyo técnico para la realización de este proyecto.

Al Dr. I. Khan, a la Dra. S. Khan y al Dr. Vamsi Madgula del National Center for Natural Products Research de la Universidad de Mississippi, E.U.A., por su apoyo brindado durante mi estancia de investigación para la realización de los ensayos de permeabilidad *in vitro*.

A la Q. Georgina Lisci y a la M. en C. Rosaisela Del Villar, miembros de la U.S.A.I., por el apoyo en Espectrometría de Masas y Resonancia Magnética Nuclear, respectivamente.

Este proyecto se llevó a cabo con el financiamiento de los siguientes proyectos:

CONACYT 82613.

DGAPA IN 205008-2.

PAIP 63908.

El trabajo realizado en este proyecto fue presentado en los siguientes congresos:

Tercera Reunión Nacional y Primera Reunión de Investigación en Productos Naturales, celebrados en Juriquilla, Querétaro del 16 al 19 de mayo del 2006, con el trabajo titulado: “Efecto sedante de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana como inductores del sueño.”

XXX Congreso Nacional de Farmacología, celebrado en Culiacán, Sinaloa del 25 al 29 de marzo de 2007, con el trabajo titulado: “Exploración del mecanismo de acción sedante de Hesperidina.”

8th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, celebrado en Portland, Maine, USA, del 14 al 18 de julio de 2007, con el trabajo titulado: “Pharmacological studies on sedative action mechanism of hesperidin.”

XXXII Congreso Nacional de Farmacología, celebrado en Oaxtepec, Morelos del 14 al 17 de junio de 2009, con el trabajo titulado: “Estudios farmacológicos recientes de hesperidina: Principio activo de las flores de azahar (*Citrus sinensis*).”

Estancia en el extranjero:

Lugar: National Center for Natural Products Research, Universidad de Mississipi. Del 7 de Enero al 30 Junio de 2008.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	X
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
SUEÑO	3
Neurotransmisores relacionados con el ciclo sueño-vigilia.	5
INSOMNIO	9
Tratamiento no farmacológico para el tratamiento del insomnio.	11
Fármacos con actividad sedante que se utilizan para el tratamiento del insomnio.	12
Plantas utilizadas en la medicina tradicional Mexicana para el tratamiento del insomnio.	15
Agentes sedantes-hipnóticos obtenidos de plantas.	17
GENERALIDADES DE LAS ESPECIES DE PLANTAS EVALUADAS EN EL CERNIMIENTO INICIAL	19
LOS CÍTRICOS	21
Generalidades de los cítricos.	21
Generalidades de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.	22
HESPERIDINA	23
MODELOS EXPERIMENTALES DE EXPLORACIÓN PARA EVALUAR EFECTO SEDANTE	25
ANÁLISIS ISOBOLOGRÁFICO	26
ENSAYOS DE PERMEABILIDAD	27
Línea celular desarrollada a partir de células de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2).	27

Línea celular Madin Darby tipo II de riñón canino con proteínas de multirresistencia a fármacos (MDR-MDCK, Multidrug Resistance Protein-Madin Darby Canine Kidney type II).	28
III. JUSTIFICACIÓN	29
IV. HIPÓTESIS	29
V. OBJETIVOS	30
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	31
PROCEDIMIENTOS GENERALES	31
MATERIAL VEGETAL Y PREPARACIÓN DE EXTRACTOS	31
Estudio biodirigido del extracto metanólico de las flores de Citrus sinensis.	34
ACETILACIÓN DE HESPERIDINA	35
MATERIAL BIOLÓGICO	35
Animales.	35
Líneas celulares.	36
FÁRMACOS	36
MEDIOS DE CULTIVO	36
DOSIFICACIÓN	37
Extractos y flavonoides.	37
Diseño de dosificación para la exploración del mecanismo de acción de hesperidina.	37
Diseño de dosificación para el estudio del efecto de la combinación de hesperidina con seis fármacos depresores del sistema nervioso central.	39
MODELO DE CILINDRO DE EXPLORACIÓN	39
ESTUDIO DEL EFECTO SEDANTE DE LA COMBINACIÓN DE HESPERIDINA CON CADA UNO DE LOS SIGUIENTES FÁRMACOS DEPRESORES DEL SNC: BUSPIRONA, DIACEPAM, DIFENHIDRAMINA, ETANOL, HALOPERIDOL Y PENTOBARBITAL	41

ANÁLISIS DE DATOS	46
ENSAYO DE PERMEABILIDAD DE HESPERETINA, GLUCOHESPERETINA Y HESPERDINA EN LAS LÍNEAS CELULARES Caco-2 y MDR-MDCK	46
Preparación de los medios de cultivo.	46
Cultivo celular.	46
Ensayos de transporte bidireccional.	47
Método analítico para la cuantificación de la cantidad transportada de los flavonoides en los ensayos de permeabilidad.	49
Método analítico utilizado para la cuantificación de la cantidad transportada de los fármacos de referencia utilizados en los ensayos de permeabilidad.	50
VII. RESULTADOS	51
VII. DISCUSIÓN	64
VIII CONCLUSIONES	75
IX. PERSPECTIVAS	77
X. BIBLIOGRAFÍA	78
XI. ANEXO	87

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Algunas de las terapias no farmacológicas para el tratamiento del insomnio.	11
2	Plantas mexicanas más utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de problemas relacionados con el SNC, organizadas en grupos por su uso medicinal y en orden decreciente a la incidencia de su uso.	16
3	Flavonoides con actividad sedante.	17
4	Generalidades sobre las especies de estudio del cernimiento inicial.	19
5	Números de registro de las muestras del material vegetal utilizadas en el cernimiento inicial.	33
6	Fármacos y dosis utilizados en la exploración del mecanismo de acción de la hesperidina.	38
7	Valores de DE_{50} sedante \pm EEM, de la hesperidina y seis fármacos depresores del SNC en ratones ICR, utilizando el modelo de cilindro de exploración.	41
8	Dosis utilizadas en el estudio de la interacción sedante entre la hesperidina y algunos fármacos depresores del SNC en ratones machos ICR.	42
9	Valores de las DE_{50} sedantes de los diferentes extractos del cernimiento inicial.	51
10	Promedio del número de levantamientos de los diferentes grupos de tratamiento para cada fármaco utilizado en la exploración del mecanismo de acción de la hesperidina utilizando el modelo de cilindro de exploración.	53
11	Valores de Z_{ad} y $Z_{exp} \pm$ EEM para la administración conjunta de hesperidina y los diferentes fármacos depresores del SNC en diferentes proporciones.	56
12	Evaluación de la actividad sedante y de cuatro compuestos relacionados estructuralmente, utilizando el modelo de cilindro de exploración	60
13	Resultados de permeabilidad de hesperetina, glucohesperetina y hesperidina a través de las monocapas de la línea celular Caco-2.	63
14	Resultados de permeabilidad de hesperetina, glucohesperetina y hesperidina a través de las monocapas de la línea celular MDR-MDCK.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Patrón de ondas presentes en el EEG humano en las diferentes etapas de sueño.	4
2	Representación esquemática de los diferentes sistemas inhibidores y excitadores del encéfalo que participan en la regulación del ciclo sueño-vigila.	6
3	Mecanismo propuesto para la inducción al sueño por parte de la prostaglandina D ₂ (PGD ₂) y la adenosina a través de los receptores A _{2a} .	8
4	Frutos y flores del árbol de naranjo (<i>Citrus sinensis</i>).	23
5	Figura que representa el modelo de cilindro de exploración.	40
6	Diagrama representativo del transporte de fármacos a través de una monocapa celular en un inserto permeable.	48
7	Efecto sedante de las fracciones del extracto metanólico de las flores de <i>Citrus sinensis</i> , comparado con la difenidramina, fármaco de referencia.	52
8	Actividad de la yohimbina (izquierda) y bupiriona (derecha) sobre el efecto sedante de hesperidina.	54
9	Acción de aminofilina (derecha) y cafeína (izquierda) sobre el efecto sedante de hesperidina.	54
10	Acción de la fenilxantina sobre el efecto sedante de hesperidina (izquierda). Acción de la fenilxantina sobre el efecto sedante de NECA (derecha).	55
11	Isoblograma 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).	57
12	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).	57
13	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).	58
14	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).	58
15	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).	59
16	Isoblograma 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).	60
17	Cromatograma de la mezcla de hesperetina (1), glucohesperetina (2), hesperidina (3) y acetilhesperidina (4).	62

ABREVIATURAS

AASM	American Academy of Sleep Medicine.
ASDC	Association of Sleep Disorders Centers.
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol.
cAMP	Adenosin monofostato cíclico.
ANADEVA	Análisis de varianza.
A-B	Flujo en dirección apical a basolateral.
B-A	Flujo en dirección basolateral a apical.
CBT	Terapia del comportamiento Cognitivo.
DSM-IV	Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.
DCSAD	Diagnostic Classification of Sleep and arousal Disorders.
DE₅₀	Dosis Efectiva 50.
DE₇₅	Dosis efectiva 75.
DMSO-d₆	Dimetil sulfóxido deuterado.
DPBS	Phosphate-Buffered Saline.
DPBS	Phosphate-Buffered Saline.
DS	Desviación estándar.
DUL	Detectable más no cuantificable.
EEG	Electroencefalograma.
EEM	Error estándar de la medio.
FDA	Food and Drug Administration.
GABA	Ácido gamma aminobutírico.
5-HT_{1A}	Receptores de serotonina 1A.
5-HT₂	Receptores de serotonina 2.
HEPES	Medio con ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico.
HPLC	High performance liquid chromatography.
ICSD	Internacional Classification of Sleep.
IL	Interleucina.
i.p.	Intraperitoneal.

Kg	Kilogramo.
LDT	Núcleo preoptico ventrolateral.
L	Litro.
MOR	Movimientos oculares rápidos.
MEM	Medio mínimo esencial.
MEM-MG	Medio mínimo esencial sodio-piruvato.
MEM NEAA	Medio mínimo esencial con aminoácidos no esenciales.
mL	Mililitro
mg	Miligramo.
MDS	Mínima diferencia significativa.
NA	No activo.
NMOR	No MOR.
NECA	5`-(N-etilcarboxamida)-adenosina.
PGD₂	Prostaglandina D2.
P-gp	Glucoproteína P.
PCPA	<i>p</i> -Clorofenilalanina.
Papp	Permeabilidad aparente.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
SFB	Suero fetal bovino.
SNC	Sistema nervioso central.
TNF	Factor de necrosis tumoral.
TMN	Núcleo tuberomamilar.
TERR	Resistencia eléctrica transepitelial.
UPLC	Ultra pressure liquid chromatography.
VLPO	Núcleo preóptico ventrolateral.
μM	Micromolar.
μg	Microgramo.

RESUMEN

El insomnio es el desorden del sueño más común y las plantas medicinales son una opción para su tratamiento. Este trabajo se inició con la evaluación del efecto sedante de diferentes extractos de *Citrus sinensis*, *Citrus limon*, *Ternstroemia pringlei*, *Ternstroemia sylvatica*, *Casimiroa edulis*, *Galphimia glauca* y *Cymbopogon citratus*, especies utilizadas tradicionalmente en México como inductoras de sueño. Para evaluar la actividad sedante se utilizó el modelo de cilindro de exploración en ratones machos ICR. El extracto más activo fue el metanólico de *Galphimia glauca* ($DE_{50} = 22.06 \pm 5.6$ mg/kg), seguido del extracto hexánico de *Cymbopogon citratus* ($DE_{50} = 27.01 \pm 2.9$ mg/kg), los extractos metanólicos de hojas ($DE_{50} = 38.48 \pm 8.0$ mg/kg) y de flores ($DE_{50} = 47.04 \pm 12.0$ mg/kg) de *Citrus sinensis*, el metanólico de *Ternstroemia sylvatica* ($DE_{50} = 61.88 \pm 6.42$ mg/kg) y el extracto de diclorometano de *Cymbopogon citratus* ($DE_{50} = 77.11 \pm 15.0$ mg/kg). Los otros extractos presentaron un valor de la DE_{50} mayor a 100 mg/Kg.

Posteriormente, el trabajo se enfocó al estudio del extracto metanólico de las flores *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, debido a que este extracto fue uno de los más activos en el cernimiento inicial. Además, las flores de *Citrus sinensis* no tenían estudios químicos ni farmacológicos previos. A través de un estudio biodirigido el flavonoide hesperidina ($DE_{50} = 11.34 \pm 2.48$ mg/kg) fue identificado como el principio activo sedante mayoritario del extracto metanólico de las flores de *Citrus sinensis*.

El estudio continuó con la exploración del mecanismo de acción de hesperidina. Para esto, se evaluó la actividad sedante de hesperidina en presencia de diversos fármacos con actividad sobre diferentes receptores, que se encuentran en el SNC y que participan en el proceso sueño-vigilia. El pretratamiento con atropina (1 mg/kg i.p.), flumacenil (2 mg/kg i.p.), clonidina (0.01 mg/kg i.p.), isoproterenol (0.3 mg/kg i.p.), haloperidol (0.3 mg/kg i.p.), WAY 100635 (3 mg/kg i.p.), *p*-clorofenilalanina (250 mg/kg i.p., dos veces al día por dos días), forskolina (3 mg/kg i.p.) o rolipram (0.173 mg/kg i.p.) no modificó el efecto sedante de hesperidina a una dosis de 30 mg/kg (DE_{75}). Sin embargo, el efecto sedante de hesperidina se potenció con yohimbina (1.25 mg/kg i.p.) o buspirona (1 mg/kg i.p.), y fue revertido con aminofilina (30

mg/kg i.p.), cafeína (30 mg/kg i.p.) o tres dosis de 1,3-dimetil-8-fenilxantina (10, 30 y 54.7 mg/kg i.p.). Estos resultados sugieren la participación de los receptores de adenosina en el mecanismo de acción sedante de hesperidina.

También se llevó a cabo el análisis isoblográfico de la interacción del efecto sedante de hesperidina con cada uno de seis fármacos depresores del SNC. Las combinaciones se evaluaron a tres proporciones de fármaco depresor del SNC-hesperidina 3:1, 1:1 y 1:3 respectivamente. La relación que se encontró entre hesperidina y buspirona, diacepam, difenhidramina, etanol o haloperidol fue aditiva, indicando que no existe interacción. La combinación pentobarbital-hesperidina en proporción 1:3 presentó una interacción subaditiva y no presentó interacción a las proporciones 1:1 y 3:1.

Otro punto que abarcó este proyecto fue la evaluación de la actividad sedante de los flavonoides hesperetina, glucohesperetina y el derivado acetilado de hesperidina, para comparar su actividad con la actividad de la hesperidina y determinar la importancia de los azúcares unidos a las agliconas, en referencia a su actividad sedante. La hesperidina (rutinósido) fue el más activo de los flavonoides evaluados en este trabajo, le siguió la glucohesperetina y el derivado acetilado de la hesperidina, mientras que la aglicona hesperetina no fue activa. Todo ello indica que, para que la molécula tenga mejor actividad sedante es importante la presencia de un disacárido (glucosa y ramnosa) no modificado.

Finalmente, se determinó la permeabilidad *in vitro* de la hesperetina, la glucohesperetina y la hesperidina en monocapas de las líneas celulares MDR-MDCK (simula barrera hematoencefálica) y Caco-2 (simula epitelio intestinal). En ambos casos la hesperidina presentó menor permeabilidad que la hesperetina y la glucohesperetina.

ABSTRACT

Insomnia is one of the most common sleep disorders; the use of medicinal plants is one option for its treatment. The sedative effect of several extracts of medicinal plants used traditionally in Mexico as sleep aids was evaluated in the exploratory cylinder model in ICR mice. The methanol extract of *Galphimia glauca* was the most active ($ED_{50} = 22.06 \pm 5.6$ mg/kg), followed by the hexane extract of *Cymbopogon citratus* ($ED_{50} = 27.01 \pm 2.9$ mg/kg), the methanol extract of leaves of *Citrus sinensis* ($ED_{50} = 38.48 \pm 8.0$ mg/kg), the methanol extract of flowers of *Citrus sinensis* ($ED_{50} = 47.04 \pm 12.0$ mg/kg), the methanol extract of *Ternstroemia sylvatica* ($ED_{50} = 61.88 \pm 6.42$ mg/kg), the dichloromethane extract of *Cymbopogon citratus* ($ED_{50} = 77.11 \pm 15.0$ mg/kg) and other extracts showed ED_{50} values over 100 mg/kg or were inactive.

In the initial screening, the methanol extract of flowers of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck was among the most active extracts. In addition, the flowers of this plant do not have previous studies about its pharmacology and chemistry. Through the bio-guide study the flavonoid hesperidin ($ED_{50} = 11.34 \pm 2.48$ mg/kg) was identified in the methanol extract as the sedative active compound of these flowers.

The sedative mechanism of the hesperidin was explored using several drugs which act over different central nervous system-receptors that participate in sleep-wakefulness process. The pre-treatment with atropine (1 mg/kg i.p.), flumazenil (2 mg/kg i.p.), clonidine (0.01 mg/kg i.p.), isoproterenol (0.3 mg/kg i.p.), haloperidol (0.3 mg/kg i.p.), WAY 100635 (3 mg/kg i.p.), p-chlorophenylalanine (250 mg/kg i.p., twice a day for 2 days), forskolin (3 mg/kg i.p.) or rolipram (0.173 mg/kg i.p.) did not modify the sedative effect of 30 mg/kg hesperidin. However, the sedative effect of this compound was potentiated by yohimbine (1.25 mg/kg i.p.) or buspirone (1 mg/kg i.p.), and reverted by the pretreatment with aminophylline (30 mg/kg i.p.), caffeine (30 mg/kg i.p.) or several doses of 1,3-dimethyl-8-phenylxanthine (10, 30 and 54.7 mg/kg i.p.). These results suggest that adenosine receptors might be involved in the sedative action of hesperidin.

Also, the isobolographic analysis was performed to evaluate the interaction of the sedative effect of hesperidin with several depressant drugs of the central nervous system. The combinations of CNS depressant drug-hesperidin were evaluated in three fixed proportions 3:1, 1:1 and 1:3. The relation found between the hesperidin and buspirone, diazepam, diphenhydramine, ethanol or haloperidol were additive, suggesting the absence of interactions. The combination pentobarbital-hesperidin in the proportion 1:3 presented subadditive interaction and did not show interactions at 1:1 y 3:1 proportions.

Furthermore, the sedative activity of hesperetin, glucohesperetin and acetyl hesperidin was evaluated to investigate the importance of the sugars attached to hesperidin on the sedative activity. The hesperidin was the most active flavonoid, followed by glucohesperetin and acetyl hesperidin, while the aglycone hesperetin was not active, indicating the importance of no modified sugars attached (glucose and ramnose) at the leader molecule.

Finally, the permeability *in vitro* of hesperetin, glucohesperetin and hesperidin was determined in MDR-MDCK (blood-brain barrier simulation) and Caco-2 (intestinal epithelial cells simulation) monolayers. The hesperidin exhibited less permeability than hesperetin or glucohesperetin, in both cell lines.

This is a contribution to the pharmacology of hesperidin on the CNS, also provide support of the popular use of *C. sinensis* flowers as sleep inducer aid.

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de las poblaciones ha traído consigo problemas de salud importantes como lo son el estrés, la ansiedad y la depresión, lo que puede llevar a padecer insomnio. El uso indiscriminado de fármacos hipnóticos para conciliar el sueño es incierto, por ejemplo, se sabe de los problemas que causan las benzodiacepinas como son resaca, dependencia, adicción, efecto de rebote al suspender la administración y subsecuente resistencia al fármaco (Charney *et al.*, 2001). Con la llegada de nuevos fármacos sedantes como el zolpidem y zaleplon, se ha logrado disminuir estos efectos, sin embargo no son fármacos que se utilicen en el caso del insomnio crónico, por lo cual se requiere del desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de éste padecimiento.

En la medicina tradicional mexicana se utilizan plantas como agentes tranquilizantes e inductores del sueño, entre las más utilizadas se encuentran la flor de tila (*Ternstroemia pringlei*), el té de limón (*Cymbopogon citratus*), las hojas y flores de naranjo (*Citrus aurantium*) y la raíz valeriana (*Valeriana procera*) (Balderas *et al.*, 2008; Tortoriello y Romero, 1992; Ugalde *et al.*, 2005). De estas plantas y de muchas otras que se utilizan con el mismo fin, no se conoce o hay controversia en la identificación de los metabolitos responsables de la actividad sedante. Por lo tanto es muy importante sustentar con ensayos farmacológicos la actividad biológica que se les atribuye, así como también conocer si son tóxicas en un corto y largo periodo de uso. Además, conociendo las sustancias activas se puede establecer el control de calidad de las drogas crudas y las preparaciones herbolarias que las contengan.

Con base en lo anterior el presente trabajo consistió, en una primera fase, en la evaluación de la actividad sedante de diferentes extractos de las especies *Citrus sinensis* (Flores de azahar y hojas), *Citrus limón* (cáscara de limón), *Cymbopogon citratus* (Zacate limón), *Citrus sinensis* (Naranjo), *Ternstroemia sylvatica* y *Ternstroemia pringlei* (Flor de tila), *Galphimina glauca* (Calderona amarilla), *Casimiroa edulis* (Zapote blanco) y *Valeriana procera* (Valeriana). De las cuales, con base a su potencia, se seleccionó al extracto metanólico de las flores de *Citrus*

sinensis para realizar un estudio biodirigido y determinar las sustancias responsables de la actividad sedante, identificándose a la hesperidina como principio activo. Además, se exploró su mecanismo de acción, la interacción con otros fármacos depresores del sistema nervioso central y se realizó el estudio de permeabilidad intestinal y a nivel de la barrera hematoencefálica utilizando modelos *in vitro*.

II. ANTECEDENTES

SUEÑO

El sueño es un estado de conciencia alterado o parcial de inconciencia, del cual el individuo puede ser despertado. Aunque aún no se entienden claramente los mecanismos y funciones del sueño, podemos decir que el sueño es un estado de reposo generalizado del organismo, durante el cual nos recuperamos del cansancio obtenido durante el día, sin el cual nuestra capacidad de aprendizaje, atención y desempeño se ven alteradas. El sueño tiene dos componentes, el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) y el sueño de ondas lentas o no MOR (NMOR). El sueño NMOR tiene cuatro etapas que podemos diferenciar de acuerdo al patrón de ondas que presentan en el electroencefalograma (EEG; **Figura 1**).

Etapa 1.- Es el estado de transición entre estar despierto y dormido, dura aproximadamente de 1 a 7 minutos. La persona se encuentra relajada, con los ojos cerrados y pensamientos ligeros. Se presentan ondas alfa, la gente que se despierta en esta etapa tiene la sensación de no haber dormido nada.

Etapa 2.- Es la primer etapa de sueño verdadero. Durante esta etapa es un poco más difícil despertar a la persona y se experimentan fragmentos de ensueños pueden ser. Los ojos pueden moverse de un lado a otro lentamente con los parpados cerrados. El EEG muestra husos de sueño (ondulaciones crecientes-decrecientes del EEG del sueño de 12 a 14 Hz, con duración de 1 a 2 segundos).

Etapa 3.- En esta etapa se tiene un sueño moderado profundo. La temperatura corporal y la presión arterial disminuyen. Es difícil despertar a la persona. El EEG muestra ondas de baja frecuencia (4-8 Hz), se presentan husos de sueño cada vez más grandes. Este estado ocurre aproximadamente 20 minutos después de iniciar el sueño.

Etapa 4 o sueño de ondas lentas.- Es la etapa de sueño mas profundo. Ondas lentas y alargadas delta predominan en el EEG (1-3 Hz). Aunque el metabolismo disminuye considerablemente durante esta etapa, muchos de los reflejos están intactos y el tono muscular solo disminuye ligeramente.

En las etapas 3 y 4 se tiene el sueño más reparador, una disminución en el tiempo de transcurso de estas etapas conlleva a un deterioro del sueño. Generalmente una persona pasa por las cuatro diferentes etapas del sueño NMOR en menos de una hora. Durante las ocho horas promedio de sueño hay de tres a cinco episodios de sueño MOR, durante el cual los ojos se mueven rápidamente debajo de los párpados cerrados. Los periodos de sueño MOR aparecen aproximadamente cada 90 minutos alternadamente entre el sueño NMOR, el primer episodio de sueño MOR dura de 10 a 20 minutos y gradualmente se hacen mas grandes hasta alcanzar 50 minutos. En los adultos el sueño MOR dura de 90 a 120 minutos en un periodo total de sueño (Berne y Levy, 2001; Tortora, 2003).

Durante el sueño ocurren muchos cambios fisiológicos. Muchos de los ensueños ocurren durante la fase MOR del sueño, y el EEG es similar al de cuando se esta despierto. Con excepción de las motoneuronas que gobiernan la respiración y el movimiento de ojos, muchas neuronas somáticas motoras están inhibidas durante el sueño MOR, el tono muscular esta disminuido y mucha gente siente momentáneamente una sensación de parálisis si son despertadas durante el sueño MOR. Durante el sueño, la división parasimpática del sistema nervioso autónomo se incrementa mientras que la actividad del simpático disminuye. La velocidad del corazón y la presión sanguínea disminuyen durante el sueño NMOR y disminuyen más durante el sueño MOR (Berne y Levy, 2001; Datta y MacLean, 2007).

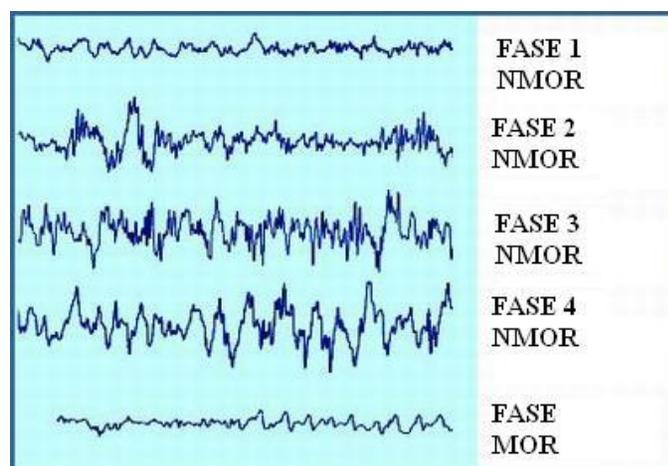


Figura 1. Patrón de ondas presentes en el EEG humano en las diferentes etapas de sueño. NMOR.- Sueño que no es de movimientos oculares rápidos. MOR.- Sueño de movimientos oculares rápidos

Neurotransmisores relacionados con el ciclo sueño-vigilia

El cronometraje del sueño esta gobernado por diferentes estructuras del SNC que regulan el ciclo sueño vigilia (**Figura 2**). De manera general podemos mencionar que uno de los factores más importantes que promueven el sueño es la disminución de la actividad de las áreas promotoras del despertar (Alóe *et al.*, 2005; Datta y MacLean, 2007; Mignot *et al.*, 2002).

Sistema activador reticular ascendente (SARA)

A continuación se enlistan los grupos de células promotoras del despertar en el SARA:

- Células sintetizadoras de norepinefrina localizadas en el locus coeruleus.
- Células sintetizadoras de serotonina en el núcleo de rafe.
- Células sintetizadoras de acetilcolina en los pedúnculos.
- Células sintetizadoras de glutamato en el mesencéfalo.
- Células sintetizadoras de dopamina en la sustancia negra compacta/área ventral-tegmental

Otros grupos de células promotores de la vigilia

- Células que contienen histamina en el hipotálamo posterior.
- Células liberadoras de hipocreatina en el hipotálamo lateral.
- Células que contienen acetilcolina en el cerebro anterior basal.
- Células del núcleo supraquiasmático.
- Células del corte prefrontal

Generación y mantenimiento del sueño de ondas largas o NMOR

La reducción de la actividad en las áreas del cerebro que promueven el despertar es uno de los eventos más importantes que preceden al sueño. El proceso ocurre vía la activación de las neuronas que contienen GABA (ácido gamma aminobutírico) y galanina en el área preóptica del hipotálamo. La síntesis de la hormona liberadora de la hormona del crecimiento, intensifica la actividad mediada por GABA y también incrementa la profundidad y duración del sueño (Alóe *et al.*, 2005; Datta y MacLean, 2007; Mignot *et al.*, 2002).

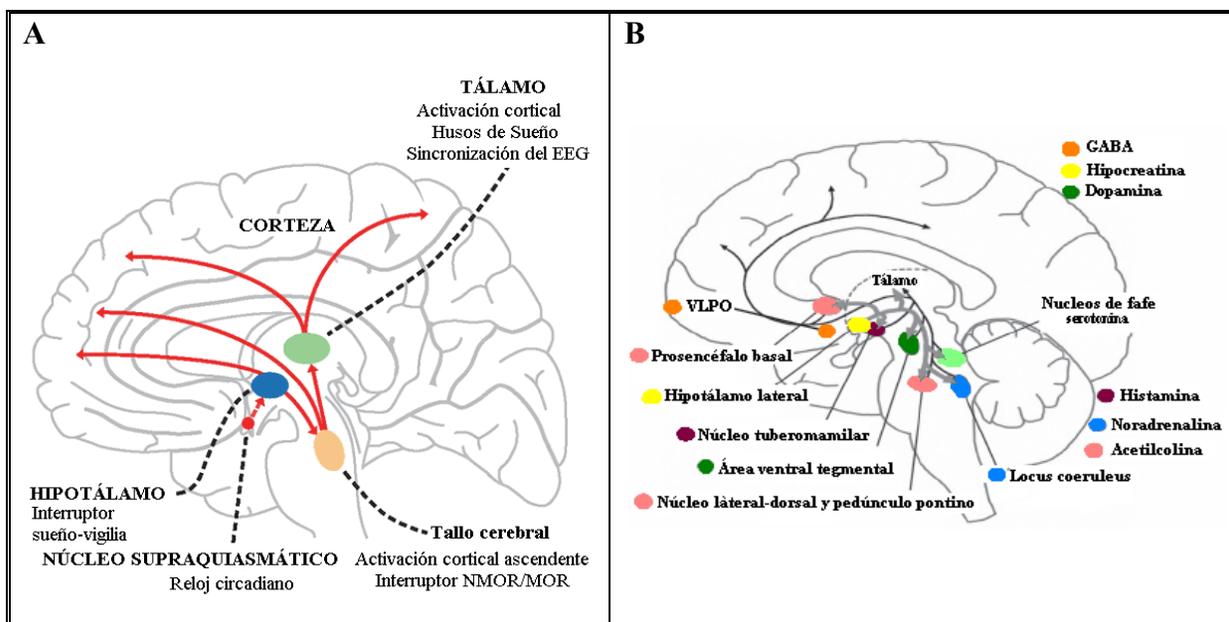


Figura 2. Representación esquemática de los diferentes sistemas inibidores y excitadores del encéfalo que participan en la regulación del ciclo sueño-vigilia. **A** Áreas del cerebro que participan en la regulación del ciclo sueño-vigilia. **B** Neurotransmisores implicados de la regulación del ciclo sueño-vigilia. EEG- electroencefalograma, NMOR- sueño no MOR, MOR- sueño de movimientos oculares rápidos, GABA- ácido amino butírico, VLPO- núcleo preóptico ventrolateral. Modificados de Alóe *et al.* y Mignot *et al.*

Generación y mantenimiento del sueño de movimientos oculares rápidos o MOR

Se ha indicado que un subconjunto de neuronas colinérgicas en el tegmento pontino de los pedúnculos y el área laterodorsal del tegmento en el tallo cerebral, son las que inician el sueño MOR. El incremento de los niveles de acetilcolina se debe al incremento en la liberación de glutamato en las áreas antes mencionadas y la activación de los receptores de Kainato a este neurotransmisor. A su vez el incremento de acetilcolina activa a las neuronas de la formación reticular pontina media, para que liberen glutamato hacia el tegmento pontino de los pedúnculos y el área laterodorsal del tegmento y por lo tanto se promueve la liberación continua (feedback loop) de acetilcolina durante el sueño MOR. La disminución de los niveles de noradrenalina y serotonina en el locus coeruleus y en los núcleos de rafe respectivamente, se deben al aumento de la liberación de GABA en estos centros (Alóe *et al.*, 2005; Datta y MacLean, 2007; Mignot *et al.*, 2002).

Por otra parte los movimientos oculares que le dan nombre a esta etapa del sueño al parecer se deben a un grupo de neuronas del área abducens que estimulan a las neuronas oculomotoras en

el núcleo abducens, que se encuentran en la formación reticular pontina media, las cuales activan a los músculos oculomotores (Datta y MacLean, 2007).

Otras sustancias que participan en el ciclo sueño-vigilia

Se han descrito otras sustancias que participan en la promoción y regulación del sueño, entre las que se encuentran neurotransmisores, hormonas y neuropéptidos (Steiger, 2006), entre los que se pueden mencionar:

Sustancias promotoras de sueño: Prostaglandina D₂, citocinas IL-1 β y el TNF α , grelina, neuropéptido Y y péptido vaso-activo.

Sustancias que producen disturbios del sueño: Hormona liberadora de corticotropina y somatostatina.

A continuación se detalla más la participación de la adenosina en el ciclo sueño-vigilia debido a que sus receptores pueden estar involucrados en el mecanismo de acción de uno de los principios activos sedantes de las flores de *Citrus sinensis* (Flores de azahar).

Adenosina

Los efectos sedantes e inductores del sueño que produce la administración sistémica y central de adenosina han sido demostrados repetidamente, existe evidencia de que los receptores A₁ y A_{2A} son mediadores de esta actividad. La administración intraperitoneal o intravenosa del agonista selectivo al receptor A₁, N⁶-ciclopentiladenosina, conlleva al sueño y a un aumento de ondas delta en el EEG durante el sueño. Estudios en gato y en rata revelaron que los efectos somnogénicos de la adenosina en el cerebro anterior basal (región colinérgica) parecen estar mediados por los receptores A₁, ya que la infusión administrada en esa región del antagonista selectivo A₁ ciclopentil-1,3-dimetilxantina, incrementa la vigilia y disminuye el sueño. Además, registros en neuronas en conjunto con microdiálisis *in vivo*, utilizando el agonista selectivo A₁, N⁶-ciclopentiladenosina, demostraron que este fármaco decrece la actividad de las neuronas “vigilia-activas”, y un antagonista selectivo al mismo receptor la aumenta (Basheer, *et al.*, 2004).

En una región diferente del cerebro, en el espacio subaracnoide debajo del cerebro anterior rostral basal, las investigaciones sugieren que la activación del receptor a prostaglandinas D_2 induce a la liberación de adenosina que a su vez ejerce su efecto somnogénico vía el receptor A_{2A} . La infusión de prostaglandina D_2 dentro del espacio subaracnoide incrementa la concentración extracelular de adenosina, además estudios sugieren que la actividad somnogénica tanto de la prostaglandina D_2 como de la adenosina se deben a su actividad en el área preóptica ventrolateral, esta área está involucrada en la inhibición del sistema ascendente histaminérgico del despertar en el núcleo tuberomamilar. La infusión del agonista A_{2A} , CGS 21680, en el espacio subaracnoide incrementa el sueño de ondas lentas y la inducción al sueño de este agonista y la prostaglandina D_2 es bloqueada por el antagonista A_{2A} , KF17837. Por lo tanto, la prostaglandina D_2 induce la liberación de adenosina en una área específica del espacio subaracnoide, debajo del cerebro anterior rostral y posteriormente la adenosina se une al receptor A_{2A} en el núcleo preóptico ventrolateral y vía proyecciones gabaérgicas se inhibe la actividad del núcleo tuberomamilar y otras áreas involucradas en el despertar (Figura 3).

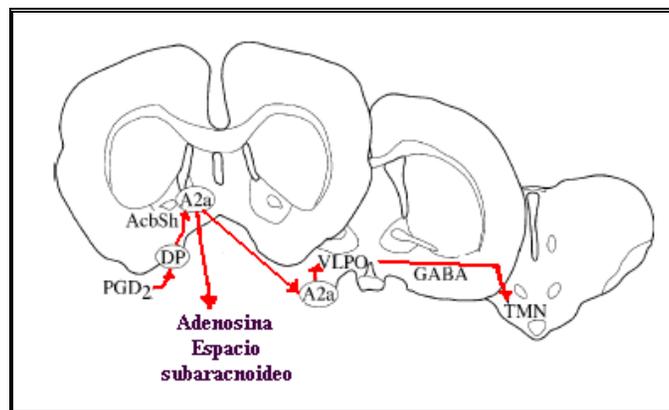


Figura 3. Mecanismo propuesto para la inducción al sueño por parte de la prostaglandina D_2 (PGD_2) y la adenosina a través de los receptores A_{2A} . La PGD_2 se une a sus receptores en las células leptomeníngicas lo que conlleva a un aumento de la concentración de adenosina en el espacio subaracnoide. La adenosina liberada se une a los receptores A_{2A} en la leptomenínge o en el núcleo accumbens. Posteriormente estas regiones a través de señales sinápticas o paracrinas, estas regiones posteriormente activan a las neuronas del núcleo preóptico ventrolateral, que liberan GABA, que a su vez inhibe el núcleo tuberomamilar y otras regiones relacionadas con el despertar y el mantenimiento de la vigilia. Modificado de Basheer, *et al.*, 2004.

El aumento crónico de las concentraciones de adenosina con cada hora de vigilia y su lenta disminución durante el sueño ha llevado a proponer la hipótesis de que la adenosina es un mediador de la somnolencia después de la vigilia prolongada. Niveles significativos de adenosina se acumulan en el cerebro anterior y en la corteza durante el tiempo que se fuerza a

mantenerse despierto más allá del tiempo normal de inicio de sueño. Un posible mecanismo de acción de la adenosina fue sugerido por los resultados de los estudios electrofisiológicos *in vitro*. Se demostró que la adenosina tiene un efecto inhibitorio postsináptico por hiperpolarización, en las neuronas del cerebro anterior, así como en las neuronas colinérgicas del núcleo laterodorsal tegmental (LDT) vía receptores presinápticos A₁. Estas observaciones soportan la teoría de que la adenosina podría promover la somnolencia por la inhibición de la liberación y actividad de neurotransmisores de las neuronas que promueven la vigilia (Basheer, *et al.*, 2004).

INSOMNIO

Un estudio epidemiológico revela que el insomnio es el desorden del sueño más común. Además el insomnio no sólo es el desorden más prevalente, sino también puede llegar a ser crónico y/o recurrente (Canals *et al.*, 1997).

La American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) define al insomnio como la incapacidad de poder conciliar o mantener el sueño, no tener un sueño reparador (una disminución de la cantidad y calidad del sueño) o bien como una alteración del patrón normal del sueño que conduce a la sensación de que éste es insuficiente (perder ritmo de sueño), con una frecuencia de tres veces a la semana durante un mes (Ringdahl *et al.*, 2004; Harvey, 2001). El insomnio crónico está definido como una dificultad para iniciar o mantener el sueño, por un periodo mayor a seis meses (American Sleep Disorders Association, 1997).

La clasificación Internacional de los desórdenes del sueño (ICSD, por sus siglas en inglés, International Classification of Sleep Disorders) fue propuesta por la Academia Americana de Medicina del Sueño (American Academy of Sleep Medicine, AASM) en asociación con la Sociedad Europea de Investigación del Sueño, la Sociedad Japonesa de la Investigación del Sueño y la Sociedad Latinoamericana del Sueño. Esta clasificación resultó de una revisión y actualización del Diagnostic Classification of Sleep and Arousal Disorders (DCSAD)

realizada inicialmente por la Association of Sleep Disorders Centers (ASDC) y la Association for the Psychophysiological Study of Sleep que fue publicado en Journal Sleep en 1979. En esta revisión se describen los nuevos desórdenes del sueño y la información que describe dichos desordenes. La ICSD clasifica al insomnio como una disomnia. Las disomnias incluyen las dificultades para dormir o mantener el sueño (insomnio) y el excesivo sueño (hipersomnia). A su vez esta sección está subdividida en tres subgrupos: desórdenes del sueño intrínsecos, desórdenes del sueño extrínsecos y desórdenes del ritmo circadiano. Los desórdenes del sueño intrínsecos se originan o desarrollan debido a una causa corporal (del organismo en sí). Los desórdenes psicológicos y desórdenes médicos que producen un desorden primario del sueño están enlistados en ese documento y se incluyen desórdenes como apnea del sueño, síndrome de las piernas inquietas, etc. Los desórdenes del sueño extrínsecos son originados o desarrollados de causas ajenas al cuerpo. Factores externos se integran para producir este tipo de desórdenes, generalmente la eliminación del o los factores causales resuelve el problema a menos de que otro desorden del sueño se haya generado durante el transcurso del primer disturbio. Los desórdenes del sueño extrínsecos incluyen problemas con la higiene del sueño, sustancias de abuso y estrés, entre otros. Los desórdenes del sueño relacionados con el ritmo circadiano, son desórdenes relativos a la regulación del sueño durante las 24 h día. Varios de estos desórdenes son influenciados por la regulación del periodo de sueño que está bajo el control de cada individuo (por ejemplo: cambio de turno de trabajo, cambio de horario debido a viajes, etc.) mientras que otros desórdenes se deben a mecanismos neurológicos (patrón irregular del ciclo sueño-vigilia), otro ejemplo es el síndrome de fase del sueño avanzado. Algunos de estos desórdenes pueden presentarse tanto en su forma intrínseca como extrínseca, sin embargo tienen en común un factor cronobiológico, patofisiológico que dicta su reconocimiento como un grupo homogéneo de desórdenes.

De acuerdo a su etiología el insomnio puede ser primario o secundario. El insomnio primario es aquel que tiene carácter de propio, o sea que no procede de ningún otro padecimiento. El insomnio secundario como su nombre lo indica es aquel que se presenta secundario a otro estado. El diagnóstico de insomnio que se da más frecuentemente es como secundario, en estos casos se supone que al tratar el padecimiento primario, el insomnio dejara de persistir.

Las enfermedades asociadas con el insomnio son muchas, entre las que se encuentran: la artritis, el dolor crónico, la falla renal crónica, las enfermedades severas del hígado, las enfermedades neurológicas, entre otras. Se ha descrito que la ansiedad es el desorden más comúnmente asociado con el insomnio seguido por la depresión. En algunos casos, el insomnio no es provocado por una enfermedad en si, sino por el tratamiento médico; por ejemplo el uso de fármacos para el tratamiento del asma o la hipertensión, producen falta de sueño (Harvey, 2001). Cabe destacar que hay poblaciones que tienden a padecer con mayor frecuencia insomnio que otras por ejemplo los ancianos y las mujeres en climaterio.

Tratamiento no farmacológico para el insomnio

El tratamiento para el insomnio debe de ser individualizado, basado en la naturaleza y severidad de los síntomas, en caso de que sea secundario a otro padecimiento lo que se debe hacer es resolver el padecimiento primario. El tratamiento no farmacológico es menos costoso y tiene menores efectos secundarios en comparación con los tratamientos con fármacos (**Cuadro 1**). Los tratamientos no farmacológicos para el insomnio son considerados efectivos si disminuyen la latencia de sueño o incrementan el tiempo total de sueño por 30 minutos. Para medir los resultados de los tratamientos se utilizan los reportes de sueño de los pacientes, estos reportes incluyen tiempo total de sueño, latencia de inicio de sueño y número de levantamientos nocturnos. El mas reciente análisis que compara los resultados obtenidos con la Terapia del Comportamiento Cognitivo (CBT, Cognitive Behavior Terapy) y la farmacoterapia no encontró diferencia entre los dos tratamientos, sólo en dos casos la CBT disminuyó mas la latencia de sueño (Sateia y Nowell, 2004).

Cuadro 1. Algunas de las terapias no farmacológicas para el tratamiento del insomnio. Actualmente un paciente puede ser sometido a varias de ellas, en lo que se denomina paquetes de multicomponentes.

Terapia para el tratamiento del insomnio	Premisa
Control de estímulos	Basada en la premisa de que el insomnio es una respuesta que se da por estímulos ambientales temporales, tiene como objetivo que los pacientes vuelvan a asociar la cama con el sueño. El paciente debe de eliminar otras actividades en la cama que no sean tener relaciones sexuales o dormir.
Intención paradójica	El paciente debe de confrontar su miedo a sentir sueño y no poder dormir, esto permite que el paciente se deje de preocupar por las consecuencias de la falta de sueño y disminuye la ansiedad para quedar dormido

Cuadro 1. Algunas de las terapias no farmacológicas para el tratamiento del insomnio. Actualmente un paciente puede ser sometido a varias de ellas, en lo que se denomina paquetes de multicomponentes.

Terapia para el tratamiento del insomnio	Premisa
Relajación	Menos efectiva que el control de estímulos o la restricción de sueño. El entrenamiento de relajación incluye relajación muscular progresiva.
Comportamiento Cognitivo	Trata las creencias disfuncionales acerca de la expectativa que se tiene del sueño y conceptos erróneos acerca de su insomnio. Se tiene evidencia de que la terapia cognitiva es tan efectiva como los tratamientos farmacológicos en los ancianos. Muchas personas que sufren de insomnio desarrollan ansiedad acerca de ir a dormir o tienen miedo a dormir poco, lo cual mantiene su insomnio (Edinger y Jeans, 2005; Ringdabl <i>et al.</i> , 2004).
Psicoterapia cognitivo-conductual	Tiene como objetivo mejorar la calidad y el estilo de vida para evitar aquellas situaciones emocionales que dificultan el buen dormir, aprender mecanismos de defensa ante situaciones de estrés, lograr un mejor control de sus emociones, mejorar las relaciones interpersonales para evitar los conflictos y motivar al paciente hacia la practica de actividades lúdicas y relajantes necesarias para el buen descanso (Sarrais y Manglano, 2007).
Restricción del sueño	Esta terapia intenta reasociar el sueño con la cama. Esta terapia establece que muchas de las personas que sufren de insomnio permanecen mas tiempo en la cama de lo que pueden dormir, por lo tanto, al estar en la cama y no poder dormir incrementan su frustración lo cual va empeorando su calidad y cantidad de sueño, por lo tanto se le indica a los pacientes que permanezcan menos tiempo en la cama y duerman menos tiempo de lo que ahora duermen, con lo cual los pacientes disminuyen su tiempo promedio de sueño lo que crea sensación de arrebatado de sueño lo que conduce a una mejora de calidad del sueño el tiempo que se duerme.
Higiene del sueño	<p>Se ha observa que seguir estas reglas puede mejora el insomnio ligero pero resultan ineficaces en el caso del insomnio severo.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Despertarse y acostarse todos los días a la misma hora. 2. Limitar el tiempo diario en cama al tiempo necesario de sueño (7.5-8 horas). 3. Suprimir la ingesta de sustancias con efecto activador o estimulador del SNC. 4. Evitar largas siestas durante el día. 5. Realizar ejercicio físico, evitando las últimas horas del día por su efecto excitante. 6. Realizar actividades excitantes en las horas previas al acostarse. 7. Tomar baños de agua a temperatura corporal por su efecto relajante. 8. Comer a horas regulares y evitar comidas copiosas cerca de la hora de acostarse. 9. Practicar ejercicios de relajación antes de acostarse. 10. Mantener condiciones ambientales adecuadas para dormir (temperatura, ruidos, luz, dureza de la cama).

Fármacos con actividad sedante que se utilizan para el tratamiento del insomnio

El término sedación se usa para designar la supresión leve de vigilia y la conducta, con reducción moderada del estado de alerta y de las respuestas a los estímulos, por lo tanto un

fármaco sedante disminuye la actividad y la agitación (Charney *et al.*, 2001). Los términos sedante e hipnótico no son sinónimos (Wheatley 2005), aunque algunos fármacos con actividad sedante también son hipnóticos, todo depende de la dosis a la que se los administre (Charney *et al.*, 2001).

Benzodiazepinas

Las benzodiazepinas se utilizan principalmente como hipnóticos, sedantes, ansiolíticos, anticonvulsivantes, relajantes musculares, como medicación preanestésica y en la anestesia (Charney *et al.*, 2001). Sus efectos resultan casi todos de sus acciones sobre el sistema nervioso central, se unen específicamente al receptor GABA_A, produciendo un aumento de la afinidad de GABA o sus agonistas (muscimol) a ese receptor, lo que conduce a una mayor activación de los canales de Cl⁻ y por lo tanto a la inhibición de la excitabilidad neuronal (Gottesmann, 2002). Las benzodiazepinas de vida media corta, disminuyen los levantamientos nocturnos e incrementan el tiempo total de sueño, sin embargo, disminuyen la duración del sueño MOR. Para el caso de los pacientes ancianos con daño renal o hepático es mejor prescribir benzodiazepinas de corta duración (triazolam) para evitar la acumulación de metabolitos en el organismo. Las benzodiazepinas con tiempo de vida media largo (flurazepam) son apropiadas para los pacientes con ansiedad. Las benzodiazepinas con tiempo de vida intermedio (temazepam o estazolam) pueden ser utilizadas en pacientes que despiertan muy temprano. El triazolam fue retirado del mercado europeo en 1991, por reportes de presencia de confusión, amnesia y problemas de comportamiento, durante su uso (Benca, 2005; Ringdahl *et al.*, 2004).

Estos fármacos desplazaron en gran medida el uso de los barbitúricos dado que tienen un índice terapéutico mayor y los efectos secundarios son menos acentuados, a pesar de ello aún producen muchos efectos adversos, dependiendo de la dosis a la que sean administradas, entre los que podemos mencionar: grados variables de laxitud, prolongación de tiempo de reacción, falta de coordinación motora, ataxia, disminución de las funciones mentales y psicomotoras, desorganización del pensamiento, confusión, amnesia anterógrada, sequedad bucal y sabor amargo. Todos estos efectos disminuyen en gran medida la capacidad de conducir y otras habilidades psicomotrices. La tolerancia puede ser desarrollada entre la primera y segunda

semana de uso. Tienen efecto de rebote que puede ocurrir al primer día después de su uso. El riesgo de rebote es más común a altas dosis de benzodiazepinas de vida media corta. El retiro gradual del medicamento puede minimizar el insomnio de rebote. Debido a que estos fármacos pueden producir adicción no se deben prescribir a pacientes con tendencias de uso de sustancias de abuso (Charney *et al.*, 2001; Ringdahl *et al.*, 2004).

Nuevos agentes sedantes con actividad en el receptor de ácido γ -aminobutírico (GABA_A)

En esta clase se incluyen principalmente zolpidem y el zaleplon, estos fármacos son hipnóticos catalogados como de corta acción. Aunque sus estructuras químicas no son del tipo de las benzodiazepinas, se unen al mismo receptor que ellas (GABA_A). El zolpidem se une a las subunidades $\alpha 1$, $\beta 2$ y $\gamma 2$, aunque tiene preferencia por la variante $\gamma 2L$, induce el sueño a dosis más bajas que las benzodiazepinas, reduce la latencia de sueño en humanos y no produce cambios significativos en la distribución del sueño. La zopiclona actúa como un agonista parcial de los receptores de benzodiazepinas, reduce la latencia de sueño en humanos, reduce la etapa I, incrementa la II, al parecer no afecta la III y IV y reduce el sueño paradójico (Gottesmann, 2002). El zaleplon y zolpidem tienen similares grados de eficacia y son efectivos en el tratamiento del insomnio que se presenta cuando se inicia el sueño. De ambos fármacos está aprobado su uso por la FDA de siete a 10 días. Se tiene evidencia de que los dos fármacos ejercen su efecto con eficacia sostenida, sin que ocurra un efecto de rebote al retirar el tratamiento. El zolpidem tiene una vida media de dos horas, lo cual es suficiente para lograr un periodo de ocho horas de sueño, está aprobado para administrarse solo antes de dormir. El zaleplon tiene un tiempo de vida media de aproximadamente una hora por lo cual ofrece la oportunidad de dosificarse durante la noche. Está indicado para su administración antes de dormir o durante la noche. Estos dos fármacos tienen diferentes efectos residuales, por ejemplo la administración de zolpidem a altas horas de la noche produce sedación en la mañana, mientras que no se ha reportado lo mismo para el zaleplon (Charney *et al.*, 2001).

Agentes que no necesitan prescripción médica

Los agentes más comunes que no requieren prescripción médica son los antihistamínicos difenhidramina y doxilamina. Entre sus efectos secundarios incluyen resequedad bucal, constipación y retención urinaria. Estos son efectivos para producir adormilamiento cuando se

está en la cama, sin embargo su tiempo de vida media es mayor a ocho horas por lo cual queda un efecto residual durante la mañana (Kamel y Gammack, 2006).

La melatonina es una hormona secretada por la glándula pineal y ha tenido publicidad como una cura a muchos desórdenes del sueño. Se secreta durante la noche y ayuda a regular el ciclo circadiano, cuando su secreción se encuentra desincronizada del ciclo luz-oscuridad se presentan disturbios del sueño. La secreción de la melatonina se ve disminuida con la edad lo cual es en parte responsable de los desordenes del sueño que se presentan en la vejez. El efecto secundario encontrado es adormilamiento diurno. La melatonina puede interactuar con la hormona luteinizante por lo que no debe ser administrada en la prepubertad o en las mujeres embarazadas. Aun no esta claro que si su administración podría suprimir la producción endógena. Un estudio no encontró ninguna mejoría de la calidad o cantidad de sueño con la administración de melatonina (Cajochen *et al.*, 2003; Ringdahl *et al.*, 2004).

Plantas utilizadas en la medicina tradicional Mexicana para el tratamiento del insomnio

Tortoriello y Romero (1992) realizó un estudio, en el que reportó 81 especies de plantas utilizadas en la medicina tradicional Mexicana para el tratamiento de diferentes padecimientos relacionados con el sistema nervioso central. Del total de las especies vegetales mencionadas el 19.7 % pertenecen a la familia Asteraceae y 12.3 % son Laminaceae, el resto pertenecen a diferentes familias. Las plantas que más frecuentemente se utilizan son naranjo (flores, llamadas flores de azahar) y Tila (flores), pertenecientes a las familias Rutaceae y Tiliaceae, respectivamente (**Cuadro 2**) (Tortoriello y Romero, 1992).

Cabe mencionar que en México las flores de azahar generalmente se comercializan como mezcla de flores de diferentes cítricos como son: naranja dulce (*Citrus sinensis*), naranja amarga (*Citrus aurantium*), mandarina (*Citrus reticulata*), limón (*Citrus limón*), lima (*Citrus aurantifolia*) y toronja (*Citrus maxima*) (Cáceres 1999; Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2007). Por otra parte, con el nombre de tila se designan especies de las familias Tiliaceae y Theaceae. La familia Theaceae incluye el género *Ternstroemia* que incluye a las especies *Ternstroemia pringlei* y *Ternstroemia sylvatica* (Balderas *et al.*, 2008; Molina, *et al.*, 1999; Tortoriello y Romero, 1992).

Cuadro 2. Plantas Mexicanas más utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de problemas relacionados con el SNC, organizadas de acuerdo a su uso medicinal y en orden decreciente a la incidencia de su uso.

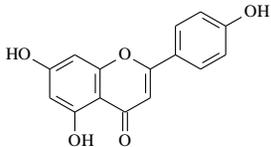
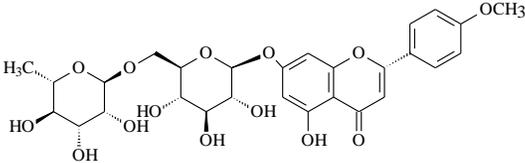
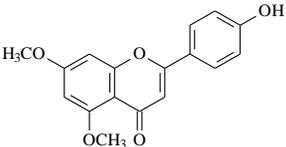
Anticonvulsivantes	Sedantes	Hipnóticos
<i>Ruta chalepensis</i> Ruda	<i>Tilia spp.</i>	<i>Citrus aurantium</i> flores Naranja
<i>Chirantodendron pentadactylon</i> Flor de manita	<i>Citrus aurantium</i> flores Naranja	<i>Calamintha macrostema</i> Poleo
<i>Tilia spp.</i> Tila	<i>Citrus aurantium</i> hojas Naranja	<i>Casimiroa edulis</i> Zapote blanco
<i>Ocimum basilicum</i> Albahacar	<i>Pasiflora spp.</i> Pasiflora	<i>Valeriana spp.</i> Valeriana
<i>Jacobina spicigera</i> Muicle	<i>Valeriana spp.</i> Valeriana	<i>Citrus aurantium</i> Naranja
	<i>Cymbopogon citratos</i> Limón	
	<i>Casimiroa edulis</i> Zapote blanco	
	<i>Agastache mexicana</i> Toronjil	
	<i>Ruta chalepensis</i> Ruda	
	<i>Ocimum basilicum</i>	
	<i>Tagetes lucida</i> Pericón	
	<i>Galphimia glauca</i> Cola de zorro	
	<i>Matricaria chamomilla</i> Manzanilla	
	<i>Papaver roheas</i> Amapola	
	<i>Turnera difusa</i> Damiana	
	<i>Marrubium vulgare</i> Manrubio	

Agentes sedantes-hipnóticos obtenidos de plantas

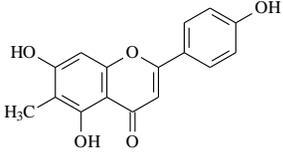
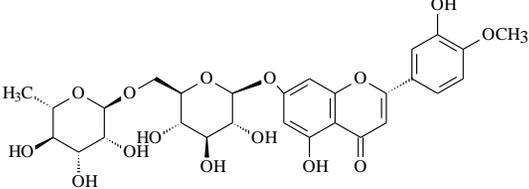
En las pasadas dos décadas hubo éxito en el descubrimiento de sustancias con actividad sedante-hipnótica, algunos ejemplos son: El ascaridol, aislado de *Chenopodium ambrosioides* (epazote); el cacalonol, aislado de *Calcitium canescens* (huira huira); y el cardenolido, aislado de *Nerium eleander* (adelfa). Entre los compuestos reportados cabe destacar a la galphimina B, aislada de *Galphimina glauca* (ojo de gallina) y a la apigenina, aislada de *Matricaria chamomilla* (manzanilla). La galphimina B es un el triterpeno que tiene potencial como sedante y muestra actividad sobre las neuronas dopaminérgicas. Por su parte la apigenina es un flavonoide que tiene propiedades sedantes y espasmolíticas, no se conoce exactamente su mecanismo de acción, pero se sugiere que esta involucrado el receptor de GABA/benzodiacepinas (Clement *et al.*, 2004).

Está reportado que algunos flavonoides tienen actividad sedante (**Cuadro 3**), por lo cual son metabolitos de interés como posibles agentes con actividad en el sistema nervioso central (Clement *et al.*, 2004; Marder *et al.*, 2003; Wasowski *et al.*, 2002)

Cuadro 3. Flavonoides con actividad sedante.

ESTRUCTURA	NOMBRE
	Apigenina
	Linarina
	5,7-Dimetoxiflavona

Cuadro 3. Flavonoides con actividad sedante.

ESTRUCTURA	NOMBRE
 <p>The structure shows a flavone core with a 4-hydroxyphenyl group at the 6-position, a methyl group at the 7-position, and hydroxyl groups at the 5 and 8 positions.</p>	6-Metilapigenina
 <p>The structure shows a flavone core with a 3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl group at the 6-position. The 7-position is substituted with a rhamnosyl group, which is further linked to a glucose molecule. The glucose molecule has hydroxyl groups at the 2, 3, and 6 positions and a methyl group at the 4 position.</p>	Hesperidina

GENERALIDADES DE LAS ESPECIES DE PLANTAS EVALUADAS EN EL CERNIMIENTO INICIAL

En el **Cuadro 4** se presenta la información general (Instituto Nacional Indigenista, 1994) sobre las especies de plantas sometidas al cernimiento inicial, para valorar la actividad sedante de diferentes extractos de cada una de ellas.

Cuadro 4. Generalidades sobre las especies de estudio del cernimiento inicial.

Especie	Usos.	Actividad biológica en SNC
<p><i>Casimiroa edulis</i> Llave and Lex <u>Familia.</u> Rutacea <u>Nombre común.</u> Zapote blanco</p>	<p>Se utilizan las hojas y los frutos para conciliar el sueño.</p>	<p>Esta reportada la actividad sedante, ansiolítica y anticonvulsiva de las hojas (Mora <i>et al.</i>, 2005; Molina-Hernández <i>et al.</i>, 2004) y la actividad anticonvulsiva de las semillas (Garzón-De la Mora <i>et al.</i>, 1999).</p>
<p><i>Citrus limon</i> (Christm.) Swingle <u>Familia.</u> Rutaceae <u>Nombre común.</u> Limón.</p>	<p>Su jugo y/o aceite esencial es utilizado en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia.</p>	<p>No tiene estudios biológicos</p>
<p><i>Cymbopogon citratus</i> (D.C.) Staff <u>Familia.</u> Gramineae. <u>Nombre común.</u> Zacate limón.</p>	<p>Se utiliza para aliviar el dolor de estómago, para sentirse bien (estimulante), sedante.</p>	<p>El aceite esencial del té de limón tiene actividad antinociceptiva en ratones administrados por vía intraperitoneal y oral (Viana <i>et al.</i>, 2000), y la infusión de hojas frescas de ésta especie produce en ratas efecto analgésico dosis-dependiente (Lorenzetti <i>et al.</i>, 1991). Con respecto a su actividad en el sistema nervioso central los resultados no son contundentes, Carlini y colaboradores (1986) reporta que la administración por vía oral e intraperitoneal del té de ésta especie a ratones, conlleva a una disminución en la coordinación motora de los roedores, lo cual es un reflejo la actividad sedante. Sin embargo, un estudio doble ciego en 50 voluntarios a los cuales se les prescribió el mismo té, indicó que este preparado no tiene actividad ansiolítica con respecto al placebo (Leite <i>et al.</i>, 1986;).</p>

Cuadro 4. Generalidades sobre las especies de estudio en el cernimiento inicial.

Especie	Usos.	Actividad biológica en SNC
<p><i>Galphimia glauca</i> Cav. <u>Familia.</u> Malpigiaceae <u>Nombre común.</u> Cola de zorro, calderona amarilla, etc.</p>	<p>Se emplea para curar heridas y granos; como antirreumática y para después del parto; como sedante, en trastornos mentales y epilepsia (Marquéz <i>et al.</i>, 1999).</p>	<p>Esta descrita la actividad sedante del extracto metanólico y además se identifico el principio activo Galfimina B (Tortoriello y Lozoya, 1991; Tortoriello y Ortega, 1993).</p>
<p><i>Terstroemia pringlei</i> Standl <u>Familia.</u> Theaceae Tila</p>	<p>Especies de tila son utilizadas en América Latina como sedantes y tranquilizantes (Molina; <i>et al.</i>, 1999). Con esté propósito se emplean las frutos secos con las que se prepara un té (Tortoriello y Romero, 1992).</p>	<p>Está reportada la actividad sedante en ratones (Balderas <i>et al.</i>, 2008).</p>
<p><i>Terstroemia sylvatica</i> Schltl and Cham. <u>Familia.</u> Theaceae. <u>Nombre común.</u> Tila.</p>	<p>Especies de tila son utilizadas en América Latina como sedantes y tranquilizantes (Molina; <i>et al.</i>, 1999). Con esté propósito se emplean las frutos secos con las que se prepara un té (Tortoriello y Romero, 1992).</p>	<p>Está reportado que tiene actividad sedante en ratas (Molina <i>et al.</i>, 1999).</p>
<p><i>Valeriana edulis ssp procera.</i> <u>Familia.</u> Valerianaceae. <u>Nombre común.</u> Raíz de gato, raíz del oso, mazatannes, valeriana, etc.</p>	<p>La raíz se usa como tranquilizante, principalmente.</p>	<p>Se han realizado sólo dos estudios acerca de su farmacología. Oliva y colaboradores (2004) reportan que el sistema GABAérgico puede estar involucrado en su actividad anticonvulsiva del extracto etanólico-acuoso de ésta especie. Ugalde y colaboradores (2005) reportan que el extracto etanólico-acuoso no potencia el efecto sedante de los fármacos que comúnmente se prescriben con actividad en el sistema nervioso central. Más recientemente esta reportado un estudio de análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución, de las diferentes especies de valeriana que se utilizan, este estudio indica que estas especies tienen en común: el flavonoide linarina, el ácido clorogénico y dos lignanos (Navarrete <i>et al.</i>, 2006), por lo cual podría especularse que alguna de estas sustancias participa en la producción del efecto sedante que presentan éstas especies.</p>

LOS CÍTRICOS

Generalidades de los cítricos

La palabra naranja viene del sánscrito “narangah”. El naranjo agrio es oriundo de Asia (India, sureste de China y sur de Vietnam), siendo posteriormente introducido y naturalizado en Europa y América (Estrada y Lara, 2008).

Los cítricos son frutos cuyo origen se remonta al menos al año 2200 a.C., fecha en la que se presentaron mandarinas y toronjas como tributos a la corte imperial de Ta Yu, en China. Se cree, sin embargo, que algunos cítricos (limones, limas y cidras) son originarios del archipiélago malayo en el sudeste asiático y que se extendieron hacia el oeste, hasta llegar a la India. Desde allí, algunos cítricos (variedades primitivas de naranjas y de los shaddocks, precursores del pomelo) llegaron hasta China (Kimball, 1999).

Se piensa que la naranja se desarrolló, hasta alcanzar su forma actual, en el este de China. La primera mención de las naranjas es la del Shunching, un libro chino del siglo sexto a.C. Las mandarinas se mencionan por primera vez en la literatura sánscrita del siglo octavo a.C. Teofrasto realiza la primera mención de la cidra en el año 310 a.C. Se cree que Alejandro Magno introdujo los cítricos en Europa entre el 300 y el 400 a.C. La literatura china menciona, en el año 200 a.C., a las mandarinas, frutos fáciles de pelar (Kimball, 1999).

El naranjo amargo (*Citrus aurantium*) se emplea desde la época de los antiguos griegos y fue cultivado en Europa a partir del siglo XII, tres siglos antes que el naranjo dulce (*Citrus sinensis*), a través de los navegantes portugueses procedentes de las Indias Orientales. En Túnez desde épocas inmemorables se rinde culto a este árbol. Las flores conocidas como azahar (en idioma árabe significa perfume), son recolectadas en dicho país a fines de marzo para adornar la celebración al árbol (Estrada y Lara, 2008).

Los romanos, que en el siglo I cultivaban naranjos en el sur de la Península Itálica (Kimball, 1999). Para referirse a la naranja amarga en latín le llamaban “aurantia”, porque cuando es perfectamente madura tiene color oro (Font, 1962), a naranjas dulces les llamaban “frutos de

la india”. Alrededor del siglo XII, las mandarinas llegaron a Japón procedentes de China. Los musulmanes trajeron los cítricos al sur de la Península Ibérica desde las abundantes plantaciones de naranjos del norte de África, cuyo origen se remonta a la citricultura europea de tiempos anteriores (Kimball, 1999).

En la edad media, el fruto de la cidra, también llamado citron (*Citrus medica*), era utilizado para dar buen olor a las ropas, tener buen aliento y como remedio al “envenenamiento”, también era utilizado en contra de los mareos y para prevenir el vómito. El agua de las flores del naranjo, agua de azahar, era utilizada como tónico para el corazón y el estómago, así como para la debilidad de las madres después del nacimiento de un niño (Álvarez y Ramón-Laca, 2005).

Las naranjas, los limones y las cidras fueron introducidos en el continente americano por Colón, que trajo las primeras semillas a la isla de Santo Domingo en 1493. En 1498, se producían abundantes naranjas en el sur de Europa. Según el historiador español Oviedo y Valdés, en torno al año 1527 existían abundantes naranjas dulces y limas en el Caribe. Las limas se extendieron hasta los cayos de Florida alrededor del año 1520 y adoptaron el nombre de limas de los “cayos” (Kimball, 1999).

El mayor productor a nivel mundial de naranjas es Brasil, le sigue Estados Unidos de Norte América y en tercer lugar se encuentra México.

Generalidades de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Familia. Rutaceae

Características botánicas. Árbol con tallo como dos palos. Hojas redondas. Flores blancas de cinco hojas, muy olorosas. La fruta es una esfera grande de color amarillo (**Figura 4**). Planta de cultivo siempre verde.

Nombre común. Las flores se conocen como azahar.

Usos. Se utilizan las flores y las hojas para el insomnio, también las hojas se usan para la presión alta y los ataques al corazón (Instituto Nacional Indigenista, 1994). Las hojas y las flores de la naranja funcionan como tranquilizantes. Para calmar nervios, dormir y sedante, se hierven 3 dedos de naranjo en 1 litro de agua, se bebe tres veces al día endulzado con miel. El

té hecho con las hojas del naranjo se bebe tibio, diariamente y por las noches, con el fin de tranquilizar los nervios (Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2007).

Química. Los estudios indican que contiene compuestos fenólicos como ácido gálico, ácido clorogénico, ácido caféico, naringina, naringenina, quercetina, hesperetina, luteolina, entre otros (Swatsitang *et al.*, 2000).

Actividad biológica en el sistema nervioso central. *Citrus sinensis* no tiene estudios de su efecto en SNC, pero es importante notar que está reportado que la hesperidina, compuesto que se encuentra en el fruto de ésta especie, tiene actividad sobre el SNC (Marder *et al.*, 2003).



Figura 4. Frutos y flores del árbol de naranjo (*Citrus sinensis*)

HESPERIDINA

La hesperidina es un glicósido de flavanona que se compone de la aglicona hesperetina, y el disacárido rutinósido (ramnosa + glucosa) (**Figura 5**). La hesperidina pura ($C_{18}H_{34}O_{15}$ y PM = 610.57) 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 el UV a 286nm.

Se encuentra presente en grandes cantidades en los frutos cítricos tales como la naranja dulce y el limón, por lo que es muy común encontrarla asociada a la vitamina C. Se ha encontrado

en especies de otras familias como en la Fabaceae, Betulaceae, Lamiaceae, Araliaceae y Papilionaceae (Garg *et al.*, 2001).

Para este flavonoide ya está reportada su actividad en el sistema nervioso central. Marder y colaboradores en el 2003 reportaron haber aislado la 2S-(-)-hesperidina de *Valeriana wallichii* y también la detectaron en *Valeriana officinalis*. Por medio de estudios con ratones y utilizando los modelos cruz elevada, campo abierto con hoyos, tiempo de sueño inducido por tiopental, se determinó que dicho flavonoide tiene acción sedante (Marder *et al.*, 2003).

Para establecer el posible mecanismo de acción sedante de hesperidina se realizaron estudios de unión ligando-receptor con los blancos en los sitio de unión de benzodiazepinas, receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₂, receptor AMPA y receptor de adenosina A₁; sin embargo los resultados indicaron que la 2S-(-)-hesperidina no es ligando para ninguno de los receptores estudiados por lo que su mecanismo de acción aún no está claro (Marder *et al.*, 2003). Todos los estudios realizados por Marder y colaboradores fueron determinados tanto con la 2S-(-)-hesperidina aislada de la valeriana así como con la hesperidina de Sigma, obtenida de cítricos, y encontraron que es un poco más activa la aislada de valeriana. Para los autores, la explicación fue que la muestra comercial es una mezcla racémica, dentro de la cual el 60% corresponde al isómero 2S-(-), por lo que también presenta actividad pero en menor magnitud (Marder *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2006;). Un estudio más reciente indica que la naltrexona, antagonista no selectivo de los receptores opioides, bloquea totalmente los efectos que tiene sobre la locomoción en ratones y antagoniza parcialmente la disminución que produce en la actividad exploratoria. La Nor-binaltorfimina, un antagonista selectivo a los receptores κ opioides, bloquea parcialmente la disminución en la actividad motora que produce la hesperidina. Por lo tanto la participación del sistema opioide en el mecanismo de acción sedante es probable (Loscalzo *et al.*, 2008).

También está reportado el estudio de la interacción entre hesperidina y diacepam, donde se determinó que al administrarse conjuntamente se potencia su acción. La determinación de esta potenciación fue realizada por medio de un análisis isoblográfico donde las proporciones 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(-). El efecto sinergista entre ellos se presentó cuando la cantidad de hesperidina, en la proporción de dosis administrada, fue mayor que la cantidad del diacepam (Fernández *et al.*, 2005).

La hesperidina posee otras actividades biológicas entre las cuales se encuentran: disminución de la fragilidad capilar (debido a la inhibición de la enzima hialuronidasa), antiinflamatoria (inhibe la liberación de histamina de los basófilos), antibacterial contra *Helicobacter pylori* entre otros (Garg *et al.*, 2001).

MODELOS EXPERIMENTALES DE EXPLORACIÓN PARA EVALUAR EFECTO SEDANTE

Existen diferentes modelos para evaluar la actividad sedante de una sustancia en animales de experimentación, pero generalmente la actividad sedante es relacionada con la disminución de la actividad motora y con una disminución en el número de levantamientos de los animales de laboratorio, que en la mayoría de los casos son ratas o ratones (Ayoka *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2000; Marder *et al.*, 2003; Rolland *et al.*, 1991; Ugalde *et al.*, 2005). La relación entre la actividad sedante con el efecto antes mencionado está de acuerdo con la definición de un sedante es decir; es aquella sustancia que ralentiza la función cognitiva, por lo tanto un fármaco sedante disminuye la actividad (Charney *et al.*, 2001; Wheatley 2005). Cabe mencionar que fármacos sedantes como los barbitúricos, a determinada dosis son sedantes y a dosis mayores son hipnóticos por lo cual inducen sueño (Gottesmann 2002; Shigemoto *et al.*, 2004). Por otro lado, otros fármacos sedantes como las benzodiazepinas también tienen efecto ansiolítico. También puede ocurrir que una sustancia tenga efecto sedante sin tener efecto hipnótico o ansiolítico como es el caso de la difenhidramina (Charney *et al.*, 2001; Passani *et al.*, 2004; Wheatley 2005).

Algunos de los modelos experimentales en los que se puede evaluar el efecto sedante son: Caja de escalera, tablero con hoyos, campo abierto y cilindro de exploración. La actividad sedante de *Eschsholzia californica*, planta utilizada en la India con analgésica y sedante se

determinó con el modelo de caja de escalera. Con el modelo tablero con hoyos se determinó la actividad sedante de la hesperidina y de la linarina, flavonoides aislados de *Valeriana officinalis* (Fernández *et al.*, 2004; Marder *et al.*, 2003). La actividad sedante del rolipram, sustancia inhibidora de la fosfodiesterasa tipo 4 que inhibe preferentemente a la formación de la adenosin 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP), se determinó utilizando el modelo de campo abierto (Silvestre *et al.*, 1999). El fundamento del modelo de cilindro de exploración, se basa en que una sustancia sedante producirá una disminución de la actividad exploratoria de un ratón cuando se coloca en un ambiente no familiar. Para evaluar la actividad sedante de una sustancia en el cilindro de exploración se cuenta el número de veces que el ratón, administrado con dicha sustancia, se incorpora verticalmente sobre sus extremidades posteriores dentro de un cilindro de vidrio, durante un período de 5 minutos, una disminución del número de incorporaciones con respecto al control indica que la sustancia tiene actividad sedante a la dosis evaluada. Con este modelo se determinó la actividad sedante del extracto hidroalcohólico de *Valeriana procera* y se realizó un estudio isobolográfico de este mismo extracto con seis de fármacos que tienen actividad depresora en el sistema nervioso central (Ugalde *et al.*, 2005).

ANÁLISIS ISOBOLOGRÁFICO

Las preparaciones herbales son una de las alternativas más utilizadas para procurar la salud (Hu *et al.*, 2005), y de acuerdo a los datos estadísticos esta tendencia va en incremento (Izzo, 2004; Venkataramanan *et al.*, 2006). En ocasiones las plantas son utilizadas en combinación con medicamentos alópatas, lo cual puede conllevar a una potencial interacción farmacocinética o farmacodinámica entre ellos (Chavez *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2006; Venkataramanan *et al.*, 2006). A pesar de ello se utilizan dichas combinaciones con la creencia de que la salud se mantendrá o mejorará de manera correcta o en menor tiempo (Venkataramanan *et al.*, 2006). Sin embargo ha sido demostrado que la administración conjunta de diferentes fármacos que presentan el mismo tipo de actividad biológica, no necesariamente conlleva a una interacción sinérgica adecuada (Goldman *et al.*, 2008), por ejemplo la administración de valeriana y diazepam (Ugalde *et al.*, 2005). Por lo tanto las combinaciones entre fármacos deben de ser evaluadas de manera correcta

porque pueden llegar a ser peligrosas para los pacientes (Balderas *et al.*, 2008), especialmente para aquellos que tienen tratamientos con fármacos de ventana terapéutica estrecha. A pesar de lo antes mencionado, no hay muchos estudios de interacción entre preparados herbales y fármacos (Butterweck *et al.*, 2004; Chavez *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2005; Izzo *et al.*, 2004; Venkataramanan *et al.*, 2006). Una de las razones por las cuales se dificulta la evaluación de la posible interacción entre un preparado herbal y un medicamento, es que los extractos en muchas ocasiones son mezclas complejas, y entre todos los componentes están las sustancias activas y cada uno de los componentes puede contribuir a una posible interacción. La identificación y separación de los componentes activos de un extracto puede simplificar los estudios de interacción, sin dejar a un lado que la mezcla de todos los componentes puede modificar los resultados.

El análisis isoblográfico ofrece una evaluación rigurosa del efecto de la combinación de dos fármacos con el mismo tipo de efecto farmacológico. El efecto de la combinación puede ser una simple adición de los efectos individuales de cada fármaco (aditividad). Por el contrario, el efecto de la combinación puede ser exagerado (sinergismo o super-aditivo) o puede ser atenuado (sub-aditivo) (Balderas *et al.*, 2008; Tallarida, 2000; Ugalde *et al.*, 2005).

ENSAYOS DE PERMEABILIDAD

Línea celular desarrollada a partir de células de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2).

En años recientes, el modelo de monocapa de las células de epitelio humano Caco-2, ha sido utilizado ampliamente como herramienta de cernimiento para predecir la absorción intestinal de fármacos y para estudios mecanísticos de transporte. En cultivo, las células Caco-2 (provenientes de células de adenocarcinoma de colon humano) se diferencian espontáneamente en la madures para formar una monocapa de células. Las células adquieren características de absorción intestinal, como una estructura de microvellosidades, expresan muchas enzimas que se encuentran en los bordes de las vellosidades como algunas enzimas CYP y enzimas de la Fase II del metabolismo como la glutatión S-transferasa y la sulfotransferasa, enzimas que hidrolizan y sistemas de transportadores para los azúcares,

aminoácidos y muchos fármacos (ejem. P-gp- glucoproteína P). Las células maduras de Caco-2 tienen muchas similitudes morfológicas, bioquímicas y funcionales (absortivas) con las de los enterocitos. Las células vecinas se adhieren unas a otras a través de uniones estrechas (muy cerradas) para formar lo que es el lado apical de la monocapa, lo que hace posible diferenciar un transporte transcelular de uno paracelular de los fármacos de prueba. La permeabilidad de los fármacos y el transporte a través de las monocapas Caco-2 correlacionan bien con la absorción intestinal *in vivo*. La característica inusual de alto grado de diferenciación en condiciones *in vitro* ha hecho de las células caco-2 el modelo más popular para estudiar el transporte de fármacos (Madgula, *et al.*, 2007).

Línea celular Madin Darby tipo II de riñón canino con proteínas de multirresistencia a fármacos (MDR-MDCK, Multidrug Resistance Protein-Madin Darby Canine Kidney type II).

Varios sistemas *in vitro* han sido utilizados para estudiar la permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica. Recientemente se ha desarrollado la línea celular MDR-MDCK como prueba de cernimiento para evaluar el transporte a través de la barrera hematoencefálica. Los resultados hasta ahora obtenidos son comparables con los resultados que se obtienen en un ensayo de captación *in vivo* en cerebro de ratón. Las células MDR-MDCK son células epiteliales que provienen de riñón de perro y además están trasfectadas con un retrovirus que acarrea el gene humano P-gp (MDR: multidrug resistance) el cual confiere una alta resistencia eléctrica transepitelial después de 8 días formando una monocapa y expresan proteínas de uniones estrechas. Estas características hacen de las células MDR-MDCK un modelo potencial para el cernimiento de la permeabilidad de sustancias a través de la barrera hematoencefálica (Madgula, *et al.*, 2007; Wang, *et al.*, 2005).

III JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de nuevos agentes que actúen en el SNC que se puedan utilizar como auxiliares en el tratamiento del insomnio crónico es muy importante, ya que el uso de fármacos sedantes a largo plazo es incierto.

Los productos naturales son una alternativa para el tratamiento del insomnio. Alrededor del mundo plantas como valeriana (*Valeriana officinalis*), flor de la pasión (*Passiflora incarnata*), lúpulo (*Humulus lupulus*) y melisa (*Melissa Officinalis*), son utilizadas para conciliar el sueño. En la medicina tradicional Mexicana existen varias especies de plantas que se utilizan con el fin de conciliar el sueño, como por ejemplo tila (*Ternstroemia pringlei* y *T. sylvatica*), naranjo (*Citrus sinensis*), toronjil (*Agastache mexicana*), ruda (*Ruta chalepensis*), zacate limón (*Cymbopogon citratus*), etc. En la mayoría de los casos las especies utilizadas tienen pocos o no tienen estudios farmacológicos, y mucho menos estudios que avalen su eficacia y seguridad terapéutica, por lo tanto es importante sustentar con ensayos biológicos la información popular que se tiene de estas plantas y conocer si poseen otros efectos. Estos estudios nos pueden llevar a descubrir nuevos agentes que actúen en el SNC como sedantes. Por último, el conocimiento químico y farmacológico de las plantas medicinales nos permite establecer el control de calidad de los preparados que las contengan.

IV HIPÓTESIS

Estudios fitoquímicos realizados sobre el fruto de *Citrus sinensis* han mostrado la presencia de flavonoides. Para algunos flavonoides como la hesperidina se ha demostrado actividad sedante, por lo cual se espera que los compuestos responsables de la actividad sedante de las flores de *Citrus sinensis* sean flavonoides, para los cuales se espera que su mecanismo de acción incluya alguno de los receptores que participan en el ciclo sueño-vigilia.

V OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar los componentes sedantes de las flores de la especie *Citrus sinensis* (naranja), utilizando el modelo de cilindro de exploración en ratones ICR y explorar el mecanismo de acción de al menos uno de ellos. Con el propósito de contribuir al conocimiento de una de las especies más utilizadas para el tratamiento del insomnio.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar el cernimiento farmacológico de la actividad sedante de plantas medicinales con reputación como auxiliares inductores del sueño en la medicina tradicional Mexicana.
- Separar por medio de un estudio biodirigido e identificar mediante procedimientos convencionales los constituyentes activos de las flores de *Citrus sinensis*.
- Explorar el mecanismo de acción de al menos una de las sustancias activas mediante los procedimientos farmacológicos apropiados, utilizando una serie de fármacos que tienen como blanco farmacológico alguno de los receptores involucrados en el proceso del sueño.
- Realizar estudios de permeabilidad con la o las sustancias activas *in vitro* en la línea celular MDR MCDK, la cual simula la barrera hematoencefálica, con la finalidad de establecer como llega el compuesto al SNC.
- Estudiar el efecto de la combinación entre una de las sustancias activas de las flores de *C. sinensis* y algunos fármacos depresores del SNC, utilizando el análisis isoblográfico, para determinar la potencial interacción entre los fitopreparados de las flores de *C. sinensis* con fármacos convencionales que actúan a nivel de SNC.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimientos generales

Los puntos de fusión de los compuestos fueron determinados en un equipo Electrothermal Digital IA9100 y no fueron corregidos. Los espectros al infrarrojo se obtuvieron preparando las muestras en pastilla de KBr, en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 599-B. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C se obtuvieron en un equipo Varian Unity Inova (300 o 75 MHz), para las muestras se utilizó como disolvente dimetilsulfóxido (DMSO- d_6) o cloroformo deuterado (CDCl_3) y como estándar interno tetrametilsilano (TMS). Los espectros de masas se obtuvieron por impacto electrónico utilizando un espectrómetro Hewlett-Packard modelo 5890, por introducción directa y se utilizó una energía de ionización de 70 eV.

Material vegetal y preparación de los extractos

Los frutos de *Ternstroemia pringlei* y de *T. sylvatica* se colectaron en Zirahuato, Michoacán y en Montellano, Puebla, respectivamente. Las flores y hojas *Citrus sinensis* se obtuvieron a través de productores de naranja de San Luís Potosí. Las hojas de *Cymbopogon citratus* y las semillas de *Casimiroa edulis* se adquirieron en el Mercado de Sonora, Ciudad de México. Se depositaron muestras del material vegetal en el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social, la homogeneidad y autenticidad de dicho material fue certificado por la M en C Abigail Aguilar, Botánica del herbario. *Galphimia glauca* fue colectada en Tehuetlan, Hidalgo, y una muestra de este material fue depositada en el Herbario de la Universidad Autónoma Chapingo. Las cáscaras secas de *Citrus limón* fueron donadas por la compañía Deshidratadora Tecomense S.A de C.V. de Colima. Una muestra comercial de raíces molidas de *Valeriana procera* fue donada por los laboratorios Mixin S.A. de C.V. Por último el extracto seco de raíces de *Valeriana officinalis* fue adquirido de la empresa Amax NutraSource Inc., EUA. Los números de registro de cada muestra se indican en el **Cuadro 5**.

Para realizar el cernimiento inicial de la actividad sedante de las especies seleccionadas, los materiales vegetales secos y molidos (100 a 300 g) se extrajeron por maceración a temperatura

ambiente (22 ± 2 °C) de manera consecutiva con hexano (3x2 L), diclorometano (3x2 L), y metanol (3x2 L), por periodos de un día. Los extractos fueron filtrados por gravedad y los disolventes fueron evaporados a presión reducida en un evaporador rotatorio. En el caso de las semillas secas de *Casimiroa edulis*; 400 g de material vegetal seco y molido se extrajeron por maceración con 2 L de una mezcla etanol-agua (7:3) por un período de tres días, posteriormente el extracto se filtró por gravedad y se secó con una corriente de aire a temperatura ambiente. Por último, 100 g de las muestras comerciales de *Valeria procera* y *V. officinalis*, fueron extraídas por maceración con una mezcla etanol-agua (7:3) por un período de tres días, posteriormente los extractos fueron filtrados por gravedad y concentrados con una corriente de aire a temperatura ambiente (22 ± 2 °C).

Cuadro 5. Números de registro de las muestras del material vegetal utilizadas en el cernimiento inicial

Nombre científico	Familia	Nombre Popular	Parte utilizada	No. de registro
<i>Casimiroa edulis</i> Llave & Lex	Rutacea	Zapote blanco	Semillas	IMSSM15457
<i>Citrus limon</i> (Christm.) Swingle	Rutaceae	Limón	Cáscara	Muestra comercial, México.
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Rutaceae	Naranja	Flores	IMSSM15436 (flores)
			Hojas	IMSSM15437(hojas)
<i>Cymbopogon citratus</i> (D.C.) Stapf	Poaceae	Zacate limón	Hojas	IMSSM15435
<i>Galphimia glauca</i> Cav.	Malpigiaceae	Cola de zorro	Parte aérea	XOLO670
<i>Ternstroemia pringlei</i> (Rose) Standl	Theaceae	Flor de tila	Frutos	IMSSM15459
<i>Ternstroemia sylvatica</i> Schltld.& Cham.	Theaceae	Flor de tila	Frutos	IMSSM15460
<i>Valeriana edulis</i> ssp <i>procera</i> (Kunth) Meyer	Valerianaceae	Valeriana	Raíces	Muestra comercial, México.
<i>Valeriana officinalis</i> L.	Valerianaceae	Valeriana	Raíces	Muestra comercial, EUA.

Estudio biodirigido del extracto metanólico de las flores de Citrus sinensis

Se utilizaron 4 kg de flores secas y molidas, las cuales se extrajeron por maceración a temperatura ambiente (22 ± 2 ° C), con hexano, diclorometano y metanol, de manera consecutiva, tres veces con cada disolvente. En cada caso se emplearon 9 L de disolvente en cada extracción. Los extractos se filtraron por gravedad y los disolventes se eliminaron a presión reducida en un evaporador rotatorio. Se obtuvieron 50 g de extracto hexánico, 37 g de extracto de diclorometano y 383 g de extracto metanólico.

Inicialmente 350 g de extracto metanólico fueron fraccionados en una columna empacada con gel de sílice. La columna cromatográfica se eluyó de manera consecutiva con los disolventes diclorometano, mezcla diclorometano-acetato de etilo (1:1), acetato de etilo y metanol. Se obtuvieron 4 fracciones, correspondientes a cada uno de los eluyentes antes mencionados. Cada una de estas fracciones se evaluó como sedante, sin embargo, ninguna de ellas fue más activa que el extracto original por lo que se realizó otro tipo fraccionamiento del extracto metanólico, un reparto agua-diclorometano. Para llevar acabo el reparto, 20 g de extracto metanólico que se disolvieron en 100 mL de agua destilada. Dicha solución se extrajo en un embudo de separación con diclorometano repetidas veces. De la interfase precipitaron 553 mg de sólido que fueron purificados con lavados con metanol y finalmente por recristalización con una mezcla de metanol-dimetilsulfóxido (3:1). Se obtuvieron 348 mg de un sólido blanco, con un p.f. de 260-262 °C. El sólido fue identificado como hesperidina por comparación de sus datos de RMN con los reportados en la literatura (Li, *et al.*, 2001; Marder *et al.*, 2003), por espectrometría de masas, así como por espectrofotometría de infrarrojo. También por comparación de su cromatograma con el de una muestra comercial de hesperidina (SIGMA).

$^1\text{HNMR}$ δ_{H} (DMSO- d_6) :11.99 (1H, s, OH-5), 9.12 (1H, s, OH-3'), 6.92 (3H, m, H-2', H-6', H-5'), 5.48 (1H, m, 2), 4.96 (1H, dd, J=7.2 and 6 Hz, H-1 glucosa) 4.50 (1H, s, H-1 ramnosa), 3.75 (3H, s, CH₃-4'), 2.75 (2H, m, H-3), 1.07 (3H, dd, J=4.8 and 1.8 Hz, CH₃-ramnosa).

$^{13}\text{CMNR}$ δ_{C} (DMSO- d_6) :197.12 (C-4), 165.08 (C-7), 163.09 (C-5), 162.65 (C-9), 148.02 (C-4'), 146.49 (C-3'), 130.98 (C-1'), 118.07 (C-6'), 114.20 (C-2'), 112.07 (C-5'), 103.40 (C-10), 100.67 (C-1 glucosa), 99.50 (C-1 ramnosa), 96.46 (C-6), 95.63 (C-8,) 78.46 (C-2), 66.09 (C-6 glucosa), 55.75 (OCH₃-4), 42.11 (C-3), 17.99 (C-6 ramnosa). EI-MS: m/z (Rel. int.): 302 (100;

aglicona, M⁺), 301(37), 285(9), 259(7), 179(19), 150(58), 137(57). : IR (KBr) ν_{\max} 3471, 2980, 2937, 2919, 1647, 1606 cm⁻¹.

Acetilación de hesperidina

A 500 mg de hesperidina comercial (Sigma) se le adicionaron 5 mL de piridina y 5 mL de anhídrido acético. Se dejó correr la reacción con agitación a temperatura ambiente por 12 h y se monitoreó su avance por cromatografía en capa fina. La reacción se detuvo agregando hielo a la mezcla de reacción y 5 mL de agua. Una vez concluida la reacción, la mezcla de reacción se extrajo con diclorometano, posteriormente la fracción de diclorometano se lavó tres veces con cada una de las siguientes soluciones de manera consecutiva: solución al 10 % de ácido clorhídrico, agua destilada, solución saturada de bicarbonato de sodio y finalmente agua destilada. Posteriormente la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y el sulfato de sodio se separó por filtración. La fase orgánica libre de agua se concentró a presión reducida y al final el matraz que contenía el concentrado se colocó sobre hielo, lo que provocó la precipitación de un sólido blanco que fue filtrado. El sólido tuvo un p.f. de 156-159 °C. Por medio del análisis de su espectro de RMN ¹H y ¹³C, y por comparación de sus datos de RMN ¹H con los reportados en la literatura (Lewin et al., 1989), se corroboró que la estructura del sólido correspondía a hesperidina acetilada en todos los hidroxilos. ¹H-RMN δ_H (CDDl₃): 2.38 (3H, s, CH₃-COO-), 2.34 (3H, s, CH₃-COO-), 2.09 (3H, s, CH₃-COO-), 2.08 (3H, s, CH₃-COO-), 2.04 (6H, s, CH₃-COO- x 2), 1.96 (3H, s, CH₃-COO-), 3.86 (3H, s, OCH₃-4'), 1.15 (3H, d, J= 6, CH₃-ramnosa) 5.02 (1H, H-1 glucosa). ¹³C-RMN δ_C (CDCl₃): 188.69 (C-4), 170.15 (-COO-), 169.99 (-COO-), 169.81, (-COO-), 169.75 (-COO-), 169.40 (-COO-), 169.31 (-COO-), 169.11 (-COO-), 168.81 (-COO-), 163.79 (C-7), 161.89 (C-9), 151.91 (C-5), 151.61 (C-3'), 139.98 (C-4'), 130.78 (C-1'), 124.92 (C-6'), 121.17 (C-2'), 112.48 (C-5'), 109.64 (C-10), 105.92 (C-1 glucosa), 102.18 (C-1 ramnosa), 98.10 (C-6), 97.64 (C-8,) 78.67 (C-2), 66.18 (C-6 glucosa), 56.03 (OCH₃-4), 44.63 (C-3), 17.28 (C-6 ramnosa).

Material biológico

Animales

En todos los experimentos se utilizaron ratones machos, de la cepa ICR, de 25 a 30 g de peso que se adquirieron del Centro UNAM-Harlan (Harlan México, S.A. de C.V.). Los animales se

mantuvieron a temperatura constante ($22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$) con un ciclo luz/obscuridad de 12 h y con libre acceso al agua y al alimento. Los procedimientos seguidos en el cuidado y manejo de los animales de experimentación cumplieron con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio) y con las reglas internacionales sobre el uso y cuidado de animales de laboratorio. Se formaron grupos con un mínimo de seis animales cada uno y en cada experimento se incluyó un grupo control.

Líneas celulares

La línea celular Caco-2 se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA). La línea celular MDR-MDCK se obtuvo como donación del Dr. Gottesman (NIH, Bethesda).

Fármacos

La difenhidramina, la hesperidina, la hesperetina, el sulfato de atropina, el flumazenil, el isoproterenol, la cafeína, el clorhidrato de clonidina, la yohimbina, el haloperidol, la buspirona, el rolipram, el WAY 100635, la forskolina, la 1,3-dimetil-8-fenilxantina, la DL-4-clorofenilalanina (*p*-clorofenilalanina, PCPA) y la 5`-(N-etilcarboxamida)-adenosina (NECA) fueron adquiridos de Sigma Co. (Sigma St Louis, MO). La aminofilina fue adquirida de ICN Pharmaceuticals Inc. (Costa Mesa, CA). El pentobarbital (Anestosal®, solución veterinaria), 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 grado HPLC, de J.T. Baker. Todos los fármacos utilizados presentaron una pureza $\geq 97\%$. El tween 80 fue adquirido de HYCEL de México, S.A. de C.V. El etanol grado analítico fue adquirido de la compañía Mallinckrodt Baker (México).

La glucohesperetina fue donada por el Dr. Alfonso Romo de Vivar del Instituto de Química de la UNAM.

Medios de cultivo

El medio mínimo esencial (MEM) 1X, el medio mínimo esencial sodio-piruvato (MEM MG) 100 X, el medio mínimo esencial con aminoácidos no esenciales (MEM NEAA) 100 X, el

medio modificado Dulbecco's Eagle's (DMEM) 1X, la solución salina balanceada Hanks (HBSS), el medio con ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES), colchicina (80 ng/mL), la tripsina, la solución de estreptomycin-penicilina (50 units/mL-50 µg/mL) y la solución amortiguadora Dulbecco's (Phosphate-Buffered Saline, DPBS) 1X fueron adquiridos de GIBCO BRL (Invitrogen Corp.; Grand Island, NY, EUA). El suero fetal bovino (SFB) fue adquirido de ATLANTA (Biologicals, S.A., EUA).

Otros insumos

Los platos Transwell® estériles de 12 (1.12 cm²) y de 6 insertos (4.67 cm²), con membranas permeables de poliéster (0.4 µm de tamaño de poro) fueron adquiridos de Costar Corp. (Cambridge, MA, EUA). Los sistemas de filtración Corning para esterilizar con membrana de acetato de celulosa (tamaño de poro de 0.22 µm) fueron adquiridos de Corning Incorporated (NY, USA). Para determinar la resistencia eléctrica trans-epitelial de las monocapas se utilizó un equipo Millicell-ERS. El agua ultrapura (resistividad 18 mΩ/cm) se obtuvo con un equipo Direct-Q 3 Millipore.

Dosificación

Extractos y flavonoides

Las sustancias puras y los extractos se suspendieron con 0.5 % de Tween 80 en solución salina al 0.9 %. Las suspensiones recientemente preparadas se administraron a los ratones por vía intraperitoneal, ajustando el volumen a 0.1 mL por cada 10 g de peso. Al grupo control se le administró sólo el vehículo.

Diseño de dosificación para la exploración del mecanismo de acción de hesperidina

Para determinar la participación de hesperidina en un determinado blanco farmacológico, se evaluó la actividad del flavonoide en presencia de diversos fármacos, dichos fármacos fueron seleccionados con base en su actividad sobre diferentes receptores que se encuentran en el SNC y que participan en el proceso sueño-vigilia. Los fármacos y dosis empleadas en este estudio se presentan en el **Cuadro 6**.

Cuadro 6. Fármacos y dosis utilizados en la exploración del mecanismo de acción de la hesperidina.

Fármaco	Dosis mg/Kg	Mecanismo de acción
Atropina	1	Antagonista a los receptores muscarínicos de acetilcolina
Flumacenil	2	Antagonista al sitio de unión de las benzodiazepinas
Yohimbina	1.25	Antagonista a los receptores α 2 adrenérgicos
Clonidina	0.01	Agonista a los receptores α 2 adrenérgicos
Isoproterenol	0.3	Agonista a los receptores β adrenérgicos
Haloperidol	0.3	Antagonista a los receptores dopaminérgicos D ₂
Buspirona	1	Agonista a los receptores 5-HT _{1A} de serotonina.
PCPA	250 cuatro veces	Inhibidor de la síntesis de serotonina
WAY 100635	3	Antagonista a los receptores 5-HT _{1A}
Forskolina	3	Activador de adenilato ciclasa
Rolipram	0.173	Inhibidor específico de la fosfodiesterasa tipo 4
Cafeína	30	Antagonista a los receptores A ₁ y A ₂ de adenosina e inhibidor inespecífico de fosfodiesterasas
Aminofilina	30	Antagonista a los receptores A ₁ y A ₂ de adenosina e inhibidor inespecífico de fosfodiesterasas.
1,3-Dimetil-8-fenilxantina	10,30,54.7	Antagonista a los receptores A ₁ y A ₂ de adenosina
5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA)	0.00547	Agonista a los receptores A ₁ y A ₂ de adenosina

Para esta serie de experimentos se utilizó una dosis de hesperidina de 30 mg/Kg, que corresponde a la DE₇₅, dosis a la cual los animales deben presentar el 75 % del efecto sedante de la hesperidina, lo cual nos ofreció la oportunidad de observar claramente algún cambio de la actividad del flavonoide en presencia de un fármaco. La hesperidina se suspendió por adición consecutiva de 10 % v/v de dimetilsulfóxido, 10 % v/v de etanol y 80 % v/v de solución salina al 0.9 %. Por otra parte, la mayoría de fármacos se disolvieron en solución salina al 0.9 %, con excepción de yohimbina, haloperidol y forskolina, los cuales se suspendieron con 0.5% de tween 80 en solución salina al 0.9 %. En el **Diagrama 1** se muestra el diseño de administración de los diferentes grupos de experimentación. Los fármacos o sus vehículos, se administraron 45 minutos antes de la prueba, con excepción de la clonidina, la buspirona (que se administró 20 minutos antes de la prueba) y el PCPA (que se administró dos veces al día, los dos días anteriores a la prueba con intervalos de 12 h). En todos los casos la hesperidina o su vehículo se administró 30 minutos antes de la prueba. La administración de todas las sustancias fue por vía intraperitoneal.

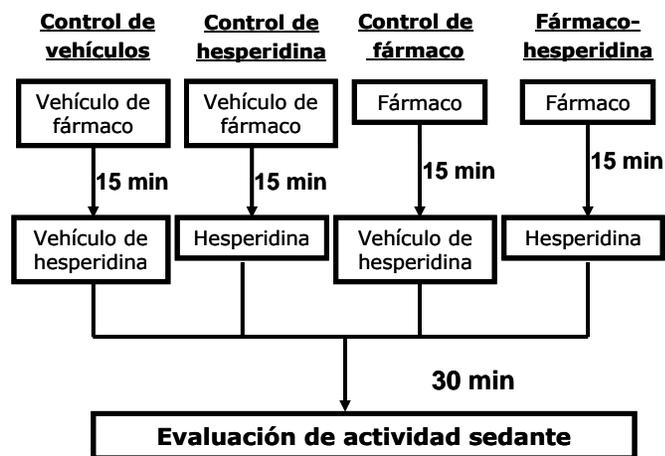


Diagrama 1. Esquema de administración utilizado para la exploración del mecanismo de acción de hesperidina. Cada grupo fue conformado de 6-12 ratones. La vía de administración fue intraperitoneal.

Diseño de dosificación para el estudio del efecto de la combinación de hesperidina con seis fármacos depresores del SNC

Para el estudio del efecto de la combinación de hesperidina con cada uno de los siguientes fármacos: Buspirona, diacepam, haloperidol, etanol, difenhidramina y pentobarbital, los fármacos fueron disueltos en solución salina al 0.9%, con excepción diacepam, haloperidol y hesperidina, los cuales fueron suspendidos con 0.5% de tween 80 en solución salina al 0.9 %. Cada fármaco y la hesperidina fueron administrados por vía intraperitoneal en un volumen de 0.1 mL por cada 10 g de peso. La hesperidina y el fármaco depresor del SNC se administraron 30 minutos antes de la prueba, con excepción de la buspirona y del etanol que se administraron 20 y 5 minutos antes de la prueba, respectivamente. La hesperidina se administró del lado derecho del peritoneo y el fármaco depresor del SNC del lado izquierdo. Cuando sólo se administró uno de los fármacos, en el lado opuesto se administró el vehículo del fármaco faltante. En cada caso, al grupo control se le administró el vehículo de la hesperidina y el vehículo del fármaco depresor del SNC.

Modelo del cilindro de exploración

Este modelo fue utilizado para determinar la actividad sedante de los extractos y sustancias, así como para la exploración del mecanismo de acción de la hesperidina y el estudio del efecto de la administración de este flavonoide con cada uno de seis fármacos depresores del SNC.

Los experimentos se realizaron en un cuarto, con temperatura y luz constante, aislado del ruido exterior. Durante la observación, el experimentador permaneció sentado junto al aparato, siempre en el mismo lugar.

Después de 30 minutos de administrar las sustancias de prueba o el vehículo, según sea el caso, los ratones se colocaron individualmente dentro de un cilindro de vidrio transparente de 30 cm de alto y 11 cm de diámetro (**Figura 5**), dicho cilindro se colocó sobre una hoja de papel. Durante un período de 5 minutos, se contó el número de veces que el ratón se incorporó verticalmente sobre sus extremidades posteriores. Después de cada evaluación, el interior del cilindro se limpió con una solución alcohólica (10%) y el papel se cambió. Una disminución en el número de levantamientos de los grupos de prueba con respecto al control, es indicativo de que la sustancia evaluada tiene actividad sedante (Oliva *et al.*, 2004; Hiller y Zetler, 1996; Ugalde *et al.*, 2005).

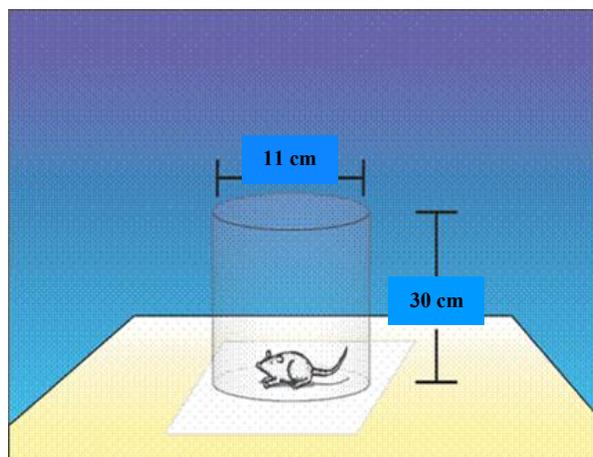


Figura 5. Figura que representa el modelo de cilindro de exploración.

Se construyeron las correspondientes curvas dosis-respuesta siguiendo el modelo logaritmico-lineal y de las curvas se obtuvieron las DE_{50} con su correspondiente error estándar de la media (EEM) por un análisis de regresión lineal (Tallarida, 2000).

Estudio del efecto sedante de la combinación de hesperidina con cada uno de los siguientes fármacos depresores del SNC: Buspirona, diacepam, difenhidramina, etanol, haloperidol y pentobarbital.

Para llevar acabo el análisis isobolográfico se consideraron las DE₅₀ de cada fármaco individual (**Cuadro 7**).

Cuadro 7. Valores de DE₅₀ sedante ± EEM, de la hesperidina y seis fármacos depresores del SNC en ratones ICR, utilizando el modelo de cilindro de exploración.

Fármaco	DE₅₀ ± EEM (mg/kg)
Hesperidina	24.80 ± 10.47
Buspirona	1.04 ± 0.17
Diacepam	3.14 ± 0.45
Difenhidramina	17.06 ± 0.67
Etanol	1938.83 ± 126.35
Haloperidol	0.41 ± 0.06
Pentobarbital	11.86 ± 0.68

Las proporciones de combinación de hesperidina-fármaco depresor del SNC que se estudiaron fueron 1:3, 1:1 y 3:1, respectivamente.

Con el valor de la DE₅₀ se calcularon las dosis teóricas aditivas (Z_{ad}), de acuerdo a la relación $Z_{ad} = fA + (1-f)B$, en donde A y B son las DE₅₀ de cada sustancia en la combinación y f es la fracción de la DE₅₀ de uno de las sustancias (A) y $(1-f)$ es la fracción de la DE₅₀ de la segunda sustancia (B), para cada una de las proporciones arriba mencionadas. Se calcularon las dosis de que se utilizaron experimentalmente de cada fármaco en la combinación manteniendo la misma proporción (**Cuadro 8**). Así para la combinación en la proporción 1:3 de la combinación de los fármacos A y B , la dosis teórica aditiva es $Z_{ad1:3} = 1/4Z_1 + 3/4Z_2$; la dosis teórica aditiva para la combinación 1:1 para estos mismos fármacos está dado por $Z_{ad1:1} = 1/2Z_1 + 1/2Z_2$ y la dosis teórica aditiva para la combinación en proporción 3:1 está dado por $Z_{ad3:1} = 3/4Z_1 + 1/4Z_2$, en todos los casos Z_1 es la DE₅₀ del fármaco A y la Z_2 es la DE₅₀ de fármaco B . Con los resultados experimentales se construyeron las correspondientes curvas dosis respuesta, donde cada Z_{ad} a cada una de las proporciones evaluadas, se colocó en el eje de las abscisas (X) y el porcentaje de efecto sedante en el eje de las ordenadas (Y). Mediante un análisis de regresión lineal de cada curva se calculó la DE₅₀ de cada combinación, denominada Z_{exp} con sus respectivos intervalos de

confianza al 95%. Los intervalos de confianza posteriormente se transformaron en el error estándar (EEM) (Balderas *et al.*, 2008; Tallarida, 2000; Ugalde *et al.*, 2005).

Cuadro 8. 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 8. (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 ^{oo}	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 8. (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	

Se realizó 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, se establecerá una relación de *superaditividad* o sinergista si $Z_{exp} < Z_{ad}$ ($M > 0$) y una relación de *subaditividad* si $Z_{exp} > Z_{ad}$ ($M < 0$). La prueba estadística aplicada es la prueba t de Student con algunas modificaciones para el análisis isobolográfico y consiste en determinar el valor de t' dado por:

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

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 et al., 1997a; Tallarida, 2000).

Otro parámetro que ayuda a determinar el tipo de interacción entre dos sustancias es la magnitud de la interacción, que mide la divergencia entre el valor experimental de la DE_{50} (Z_{exp}) de la combinación y el valor de la DE_{50} teórica (Z_{ad}), para determinar este valor se utilizó la ecuación básica del análisis isoblográfico: $a/A + b/B$, donde A es el valor de la DE_{50} de la hesperidina y B es el valor de la DE_{50} del fármaco depresor del SNC, por su parte, los valores de a y b son las cantidades utilizadas de cada fármaco en la combinación. (Balderas *et al.*, 2008; Tallarida, 2000; Ugalde *et al.*, 2005). La magnitud de la interacción se expresa sustituyendo en la ecuación básica $a/A + b/B$ los valores de $a = \rho_A Z_{ex}$ y $b = \rho_B Z_{ex}$, para obtener las cantidades de cada fármaco en la combinación, donde $\rho_A = fA/Z_{ad}$ y $\rho_B = (1-f)B/Z_{ad}$. Para que el efecto de una combinación sea aditivo se debe de cumplir con la relación $a/A + b/B = 1$. De manera contraria, si el valor es diferente de 1 se determinó que hubo una interacción entre el fármaco depresor del SNC y la hesperidina. 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 (Balderas *et al.*, 2008; Tallarida, 2000; Ugalde *et al.*, 2005).

El isoblograma es la gráfica que permite la visualización de las dosis equiefectivas de los fármacos individuales y en la combinación. Los valores de las dosis aditivas teóricas, de las diferentes combinaciones, caen sobre la línea de aditividad. Los valores de las dosis experimentales que caen abajo y a la izquierda de la línea de aditividad y fuera de la zona de aditividad sugieren una interacción sinergista o *superaditiva*, en tanto que los valores de las dosis experimentales que caen arriba y a la derecha de la línea de aditividad, y de igual forma fuera de

la zona de aditividad sugieren una interacción atenuante o *subaditiva* (Balderas *et al.*, 2008; Tallarida, 2000; Ugalde *et al.*, 2005).

Análisis de datos

Las diferencias entre grupos experimentales se obtuvieron a través de un análisis de varianza de una vía (ANADEVA) seguida por la prueba de la mínima diferencia significativa (MDS) de Fisher.

Ensayos de permeabilidad de hesperetina, glucohesperetina y hesperidina en las líneas celulares Caco-2 y MDR-MDCK

Preparación de los medios de cultivo

Preparación de 500 mL del medio de cultivo para las células Caco-2

Se mezclan en un sistema de filtración Corning, para su esterilización por filtración al vacío, MEM MG (5 mL), MEM NEAA (5 mL) y estreptomycin-penicilina (5 mL), después la mezcla se lleva a un volumen de 400 mL con MEM y se filtra, al final se filtra el FBS (100 mL).

Preparación de 500 mL de medio del cultivo para las células MDR-MDCK

Se mezclan en un sistema de filtración Corning, para su esterilizaron por filtración al vacío, MEM MG (5 mL), MEM NEAA (5 mL), estreptomycin-penicilina (5 mL) y Colchicina (1mL), después la mezcla se lleva a un volumen de 450 mL con DMEM y se filtra, al final se filtra el FBS (50 mL).

Preparación de 500 mL de medio de medio de transporte

A 50 mL de solución HBSS, se le adicionan 5 mL de solución HEPES, posteriormente la mezcla se lleva a un volumen de 500 mL con agua de ultrapura y se agita constante durante 5 minutos, al final la mezcla se debe de ajustar aun pH de 7.

Cultivo celular

El cultivo celular de Caco-2 se desarrolló en medio de cultivo con MEM, a 37 ° C, en atmósfera al 5% de CO₂ y humedad relativa de 95 %. Para los experimentos de transporte se tomaron células que se encontraban entre las resiembras 28 a 43 y fueron sembradas en cada inserto permeable 63 000 células/cm². Los volúmenes de las cámaras apicales son 0.6 mL y

basolaterales 1.6 mL en las placas de 12 pozos y 1.5 mL y 2.6 mL en las placas de 6 pozos respectivamente. El medio de cultivo que alimentaba a las células se cambió por medio fresco a las 24 horas de ser sembradas, posteriormente tres veces por semana durante 21 días. El buen desarrollo de las monocapas se determinó por observación al microscopio y por sus valores de resistencia eléctrica trans-epitelial (TEER). Los valores de TEER están directamente relacionados con la integridad de la monocapa, ya que entre mayor sea este valor indica que las uniones entre células son más estrechas, por el contrario, un valor bajo de TEER indica que posiblemente la monocapa se encuentra fracturada, o simplemente no se formó. Para los experimentos de permeabilidad sólo se utilizaron las monocapas que tuvieron valores de TEER mayores a 400 ohm cm².

El cultivo celular de MDR-MDCK se desarrolló en medio de cultivo con DMEM, a 37 ° C, en atmósfera al 5 % de CO₂ y humedad relativa de 95 %. Para los experimentos de transporte se tomaron células que se encontraban entre las resiembras 12 a 40 y fueron sembradas en cada inserto permeable 75 000 células/cm². Los volúmenes de las cámaras apicales son 0.6 mL y basolaterales 1.6 mL en las placas de 12 pozos y 1.5 mL y 2.6 mL en las placas de 6 pozos respectivamente. El medio de cultivo que alimentaba a las células se cambió por medio fresco diariamente durante una semana. El buen desarrollo de las monocapas se determinó por observación al microscopio y por sus los valores de TEER. Para los experimentos de permeabilidad sólo se utilizaron las monocapas que tuvieron valores de TEER mayores a 1100 ohm/cm².

Ensayos de transporte bidireccional

Para llevar a cabo la evaluación de la permeabilidad en las monocapas de hesperetina, glucohesperetina y hesperidina, se prepararon soluciones stock de 10 mM en DMSO, a partir de ellas se prepararon las soluciones de prueba a una concentración 200 µM en medio de transporte. Las concentraciones seleccionadas de los compuestos dependieron de experimentos de prueba previos y de la sensibilidad del método analítico utilizado para la cuantificación.

Las monocapas fueron alimentadas con el medio de cultivo apropiado el día del ensayo. Dos horas después de la alimentación, fueron lavadas dos veces con el medio de transporte y

posteriormente equilibradas con el mismo por 30 minutos a 37 ° C, en atmósfera al 5 % de CO₂ y humedad relativa de 95 %. Antes de realizar el experimento se evaluaron los valores de resistencia eléctrica de cada monocapa.

En el caso de la línea celular Caco-2, se utilizaron como fármacos control propranolol (200µM) y atenolol (200µM). El propranolol que es fármaco catalogado como de alta solubilidad-alta permeabilidad y el atenolol es considerado como un fármaco de alta solubilidad-baja permeabilidad. En los experimentos con la línea celular MDR-MDCK se utilizó como fármaco de referencia la cafeína (50 µM), fármaco que atraviesa pasivamente la barrera hematoencefálica, además como control negativo se utilizó el atenolol (200µM).

El experimento se inicia cuando se adiciona la solución del compuesto o del fármaco de referencia a evaluar en el compartimiento apical, en el caso del transporte apical a basolateral: A-B, o bien, en el compartimiento basolateral, en el caso del transporte basolateral a apical: B-A (**Figura 6**). Para el caso de la línea celular Caco-2 el transporte de las sustancias se llevó a cabo a pH 7 y pH 6 en el compartimiento apical.

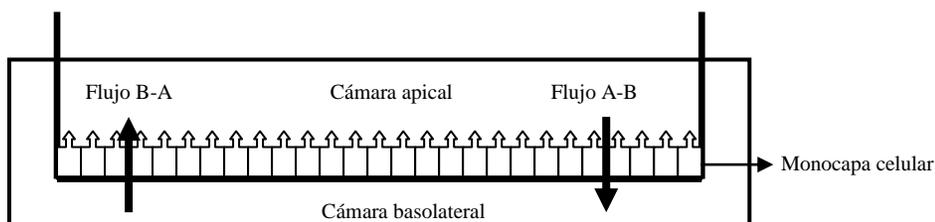


Figura 6. Diagrama representativo del transporte de fármacos a través de una monocapa celular en una membrana permeable.

Los volúmenes de las cámaras apicales son 0.6 mL y basolaterales 1.6 mL en las placas de 12 pozos y 1.5 mL y 2.6 mL en las placas de 6 pozos respectivamente. Las placas fueron incubadas por 2 horas en agitación constante suave. Cada 15 minutos se tomaron muestras de las cámaras basolaterales (para el transporte A-B) y de las cámaras apicales (para el transporte B-A), en cada ocasión el medio tomado fue repuesto por medio. Al final del experimento se tomo una muestra de cada una de las cámaras apicales (para el caso del transporte A-B) y basolaterales (para el caso del transporte B-A). Al final del experimento la integridad de las monocapas fue determinada por sus valores de resistencia eléctrica y también por monitoreo del transporte de luciferina amarilla (Ly) a través de ellas, por una hora, a una concentración de

100 µg/mL, este compuesto es un marcador fluorescente del transporte paracelular (transporte entre las células).

$$\text{TEER} = (R_{\text{Mono}} - R_{\text{Blank}}) \times A$$

Donde R_{Mono} = Resistencia filtro de la monocapa celular, R_{Blank} = resistencia filtro, A = área del filtro.

La concentración de los compuestos de prueba al inicio del experimento y de las muestras colectadas fue determinada por HPLC y la concentración de los fármacos de referencia al inicio del experimento y en las muestras colectadas fue determinada por UPLC, siguiendo las metodologías descritas más adelante. La cantidad acumulativa de sustancia transportada es graficada vs el tiempo para obtener la velocidad de transporte (dq/dt). La permeabilidad aparente (P_{app} , cm/sec) fue calculada con la siguiente ecuación:

$$P_{\text{app}} = (dq/dt) \times 1/C_o \times 1/A$$

Donde dq/dt = velocidad de transporte, C_o = concentración inicial en el compartimiento donador, A = superficie de área del filtro. El radio de flujo fue calculado con la siguiente ecuación: $P_{\text{appB-A}}/P_{\text{appA-B}}$

Método analítico utilizado para la cuantificación de la cantidad transportada de los flavonoides en los ensayos de permeabilidad

Se utilizó un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución Waters (Waters Corp.; Milford, MA, USA). El equipo incluye bombas modelo 6000A, inyector modelo U6K, controlador automático de gradiente modelo 680, detector con arreglo de fotodiodos modelo 996 y un sistema computarizado para la adquisición de datos equipado con el software Empower 2. Se utilizó una columna Luna C18 (Phenomenex, 150 x 4.6mm D.I.; 5 µm de tamaño de partícula; Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) y se mantuvo a 35 °C durante los análisis. Se utilizó una precolumna de 2 cm de longitud LC-18 (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA). La fase móvil consistió de agua (0.1% ácido acético) (A) y acetonitrilo (con 0.1 % ácido acético) (B), los cuales se aplicaron en el siguiente gradiente de elusión: Inicio 95% A y 5% B hasta alcanzar 100% B a 15 minutos. Después de cada corrida la columna se lavó durante 5 minutos con 100 % B y posteriormente siguió un período de equilibrio con la fase móvil inicial de 15 min. La velocidad de flujo fue de 1.0 mL/min.

La especificidad del método fue determinada para hesperetina, glucohesperetina y hesperidina. En el cromatograma, las señales correspondientes a cada uno de los flavonoides presentaron buena resolución y no se presentó interferencia con otros picos. Las curvas de calibración tuvieron un rango lineal de 0.5-100 µg/mL y todas mostraron una correlación entre el área de los picos y la concentración de los compuestos ($r^2 = 0.999$). El límite de detección para los tres flavonoides fue de 50 ng/mL.

Método analítico utilizado para la cuantificación de la cantidad transportada de los fármacos de referencia utilizados en los ensayos de permeabilidad

Las cantidades de atenolol, propanolol y cafeína (fármacos control) transportadas a través de las monocapas fueron cuantificadas por cromatografía de líquidos de ultra alta resolución, UPLC por sus siglas en inglés. Todos los análisis se llevaron a cabo en un sistema Waters Acquity UPLC acoplado a un espectrometro de masas (Waters Corp., Milford, MA, USA). El equipo incluye un controlador binario de disolventes, inyector, compartimiento para columna y detector de arreglo de fotodiodos, el equipo se encuentra conectado a un sistema computarizado para la adquisición de datos equipado con el software Empower 2. Se utilizó una columna Waters Acquity UPLC Shield RP18 (50mm x 2.1 mm D.I., 1.7 µM). La temperatura de la columna y de las muestras fue de 35 °C y 25 °C respectivamente. La fase móvil consistió de agua (con 0.05 % de ácido fórmico) (A) y acetonitrilo (con 0.05 % de ácido fórmico) (B), los cuales se aplicaron en el siguiente gradiente de elusión: Inicio 99% A y 1 % B por 2 minutos, después llega hasta 100 % B en 5 minutos y así permanece por 2 minutos. La composición de la fase móvil cambió de manera lineal (Curva Waters tipo 6). La velocidad de flujo fue 0.25 mL/min y el tiempo total de análisis fue de 7 minutos.

El espectrómetro de masas fue acondicionado a su sensibilidad máxima. La fuente térmica y la temperatura para la nebulización de la muestra (formación de spray) fue de 150 °C y 350 °C respectivamente. El voltaje de la sonda (voltaje de capilar), el voltaje de cono y el voltaje del extractor fueron de 3.0 kV, 37 V y 3 V respectivamente. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador (650 L/h) y secado (50 l/h). El equipo fue programado para la detección selectiva de los iones $[M + H]^+ = 667.3, 260.3$ y 195.2 para atenolol, propanolol y cafeína (registro selectivo de iones, RSI). Los espectros de masas fueron obtenidos del RSI en 0.1 s y la velocidad de exploración fue de 500 Da/sec. El volumen de inyección fue de 10 µL.

VII. RESULTADOS

En el **Cuadro 9** se muestran las DE₅₀ de los extractos activos evaluados inicialmente, también se indica cuales extractos no fueron activos. El extracto más activo fue el extracto metanólico de *Galphimia glauca*, seguido por el extracto hexánico de *Cymbopogon citratus*, los extractos metanólicos de las hojas y de las flores de *Citrus sinensis*, el metanólico de *Ternstroemia sylvatica* y el de diclorometano de *Cymbopogon citratus*, los demás extractos tienen DE₅₀ mayores a 100 mg/kg ó no fueron activos.

Cuadro 9. Valores de las DE₅₀ sedantes de los diferentes extractos del cernimiento inicial.

Especie	Parte de la planta	Extracto	DE ₅₀ ± EEM (mg/Kg)
<i>Cymbopogon citratus</i>	Hojas	Hexano	27.71 ± 2.9
		Diclorometano	77.11 ± 15.0
		Metanol	NA
<i>Citrus limon</i>	Cáscara	Hexano	NA
		Diclorometano	NA
		Metanol	355.70 ± 71.5
<i>Citrus sinensis</i>	Flores	Hexano	NA
		Diclorometano	129.15 ± 21.25
		Metanol	47.04 ± 12.0
<i>Citrus sinensis</i>	Hojas	Hexano	400.21 ± 59.4
		Diclorometano	NA
		Metanol	38.48 ± 8.0
<i>Galphimia glauca</i>	Parte aérea	Hexano	76.85 ± 20.9
		Diclorometano	NA
		Metanol	22.06 ± 5.6
<i>Ternstroemia pringlei</i>	Frutos	Hexano	558.00 ± 46.59
		Diclorometano	631.00 ± 181.4
		Metanol	319.00 ± 49.62
<i>Ternstroemia sylvatica</i>	Frutos	Hexano	752.10 ± 208.44
		Diclorometano	743.10 ± 208.34
		Metanol	61.88 ± 6.42
<i>Casimiroa edulis</i>	Semillas	Etanol-agua	802.80 ± 165.77
<i>Valeriana edulis ssp procera</i>	Raíces	Etanol-agua	182.62 ± 11.62
<i>Valeriana officinalis</i>	Raíces	Etanol-agua	452.01 ± 47.45
Difenhidramina			17.06 ± 2.04

NA: no activo hasta 1600 mg/kg

Después de analizar los resultados del cernimiento inicial se decidió enfocar el proyecto al estudio del extracto metanólico de las flores de *C. sinensis* (**Cuadro 9**). Del fraccionamiento de dicho extracto por un medio de un reparto agua-diclorometano, se obtuvo un sólido, la fracción orgánica y la fracción acuosa. El sólido antes de ser purificado presentó una DE₅₀ de

24.88 ± 10.47 mg/Kg, y después de purificarlo de 11.34 ± 2.48 mg/Kg. La fracción acuosa y la orgánica presentaron baja actividad hasta 1000 mg/Kg (**Figura 7**).

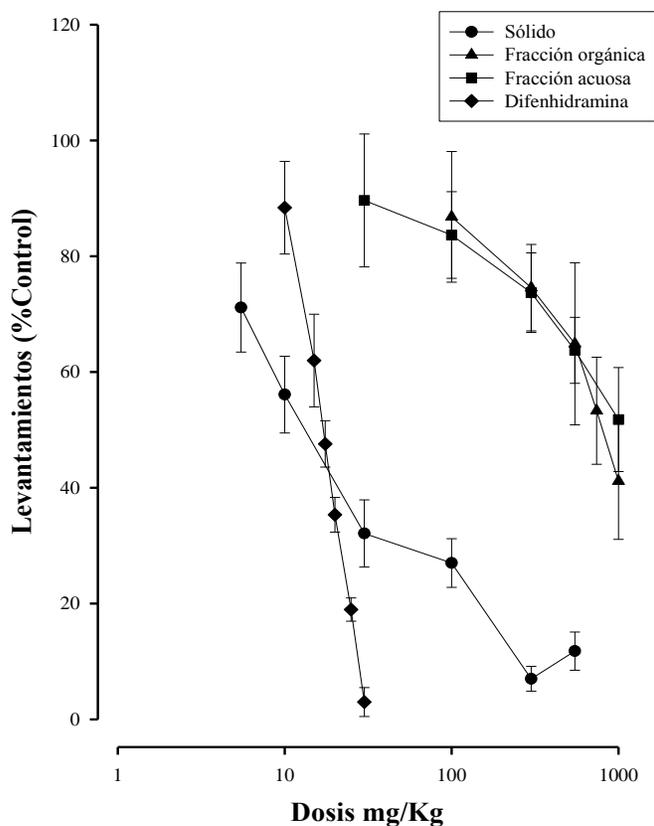


Figura 7. Efecto sedante de las fracciones del extracto metanólico de las flores de *Citrus sinensis*, comparado con la difenhidramina, fármaco de referencia.

Una vez que se determinó que la hesperidina es uno de los principios activos sedantes de las flores de *C. sinensis*, se procedió a explorar su mecanismo de acción.

El tratamiento previo y por separado con atropina (1 mg/Kg), flumacénil (2 mg/Kg), clonidina (0.01 mg/kg), isoproterenol (0.3 mg/Kg), haloperidol (0.3 mg/Kg), WAY 100635 (3 mg/Kg), PCPA (250 mg/Kg x 4), forskolina (3 mg/Kg) o rolipram (0.173 mg/Kg) no modificó la actividad sedante de la hesperidina (**Cuadro 10**). Por otra parte, el tratamiento previo con yohimbina (1 mg/Kg) o buspirona (1 mg/Kg) incrementó el efecto sedante de hesperidina **Figura 8**, mientras que el pretratamiento con aminofilina (30 mg/Kg), cafeína (30 mg/Kg) **Figura 9** o varias dosis de 1,3-dimetil-8-fenilxantina (10, 30, 54.7 mg/kg) **Figura 10** revirtió el efecto sedante de la hesperidina.

Cuadro 10. Promedio del número de levantamientos de los diferentes grupos de tratamiento para cada fármaco utilizado en la exploración del mecanismo de acción de la hesperidina, utilizando el modelo de cilindro de exploración.

Fármaco	Dosis mg/Kg del Fármaco	Control	Fármaco solo	Hesperidina sola (30 mg/kg)	Hesperidina (30 mg/kg) más fármaco
Atropina	1	46.25 ± 3.45	48.0 ± 7.69	18.27 ± 2.50 ^a	25.50 ± 7.24 ^a
Flumacenil	2	43.17 ± 7.59	47.8 ± 3.34	14.4 ± 4.58 ^a	19.00 ± 4.25 ^a
Clonidina	0.01	30.50 ± 6.14	24.83 ± 6.47	7.83 ± 1.96 ^a	8.50 ± 2.30 ^a
Isoproterenol	0.3	37.67 ± 5.82	30.83 ± 2.76	10.67 ± 1.8 ^a	19.33 ± 2.74 ^a
Haloperidol	0.3	42.40 ± 1.33	30.25 ± 6.26 ^a	13.40 ± 2.62 ^a	10.20 ± 2.50 ^a
WAY 100635	3	47.33 ± 3.39	43.00 ± 2.51	22.00 ± 2.76 ^a	25.6 ± 5.15 ^a
<i>p</i> -Clorofenilalanina	250	42.17 ± 5.74	37.50 ± 5.43	13.60 ± 4.31 ^a	12.83 ± 2.18 ^a
Forskolina	3	46.60 ± 2.67	45.6 ± 5.68	22.25 ± 3.04 ^a	15.49 ± 6.32 ^a
Rolipram	0.173	56.67 ± 5.81	62.17 ± 5.47	18.33 ± 2.02 ^a	27.67 ± 4.11 ^a

Cada valor es la media de seis ratones ± E.E.M. ^a Diferencia significativa con el grupo control (p ≤ 0.5).

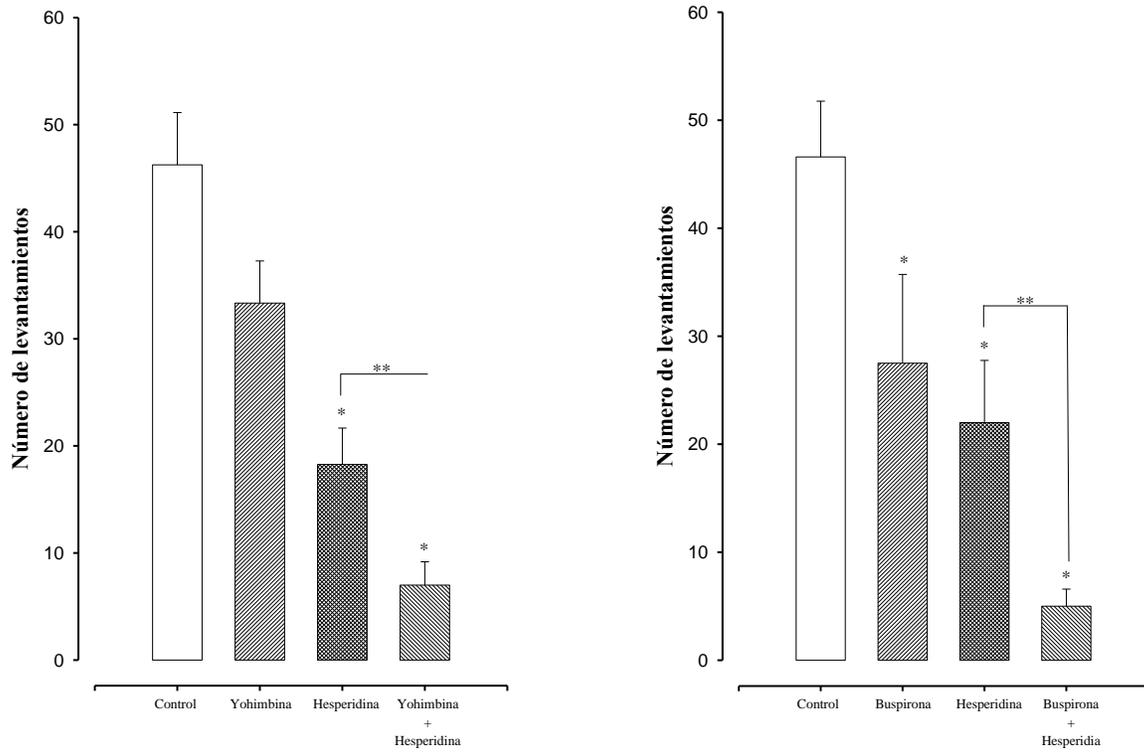


Figura 8. Actividad de la yohimbina (izquierda) y buspirona (derecha) sobre el efecto sedante de hesperidina.

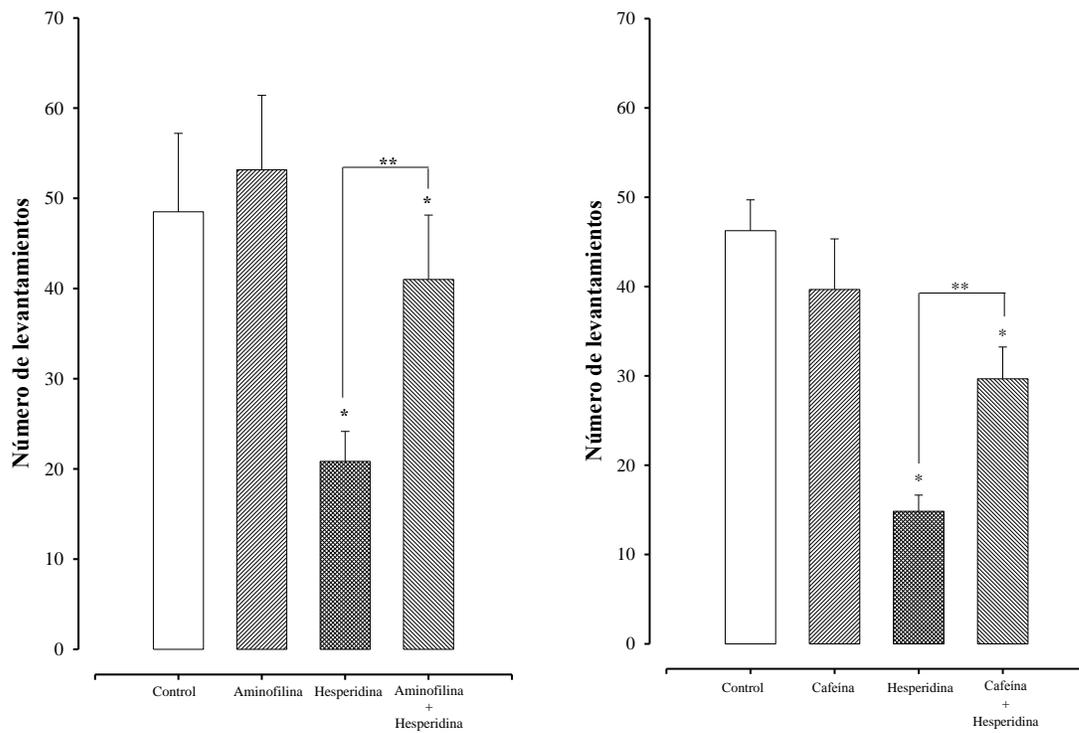


Figura 9. Acción de aminofilina (izquierda) y cafeína (derecha) sobre el efecto sedante de hesperidina.

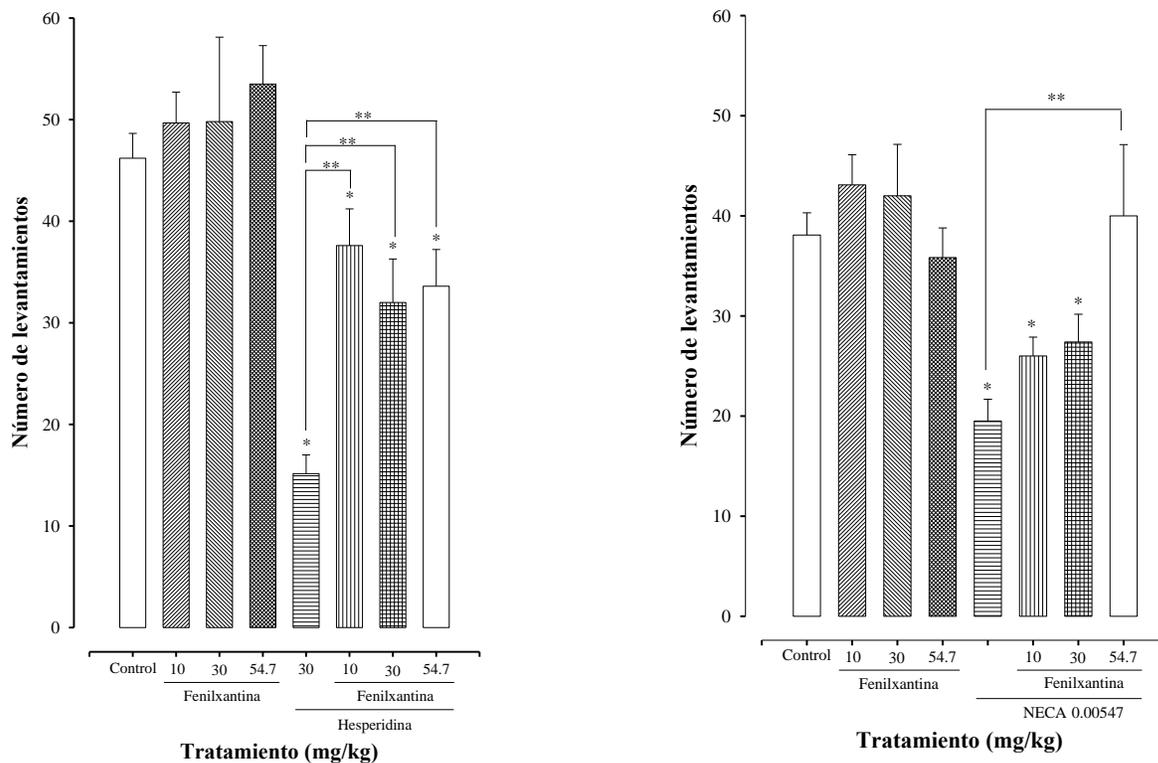


Figura 10. Acción de la fenilxantina sobre el efecto sedante de hesperidina (izquierda). Acción de la fenilxantina sobre el efecto sedante de NECA (derecha).

Para tener mayor información que apoye la exploración del mecanismo de acción de la hesperidina y por añadidura, ampliar el conocimiento en la farmacología de la hesperidina, se decidió determinar el efecto de la combinación de este flavonoide con varios fármacos depresores del SNC, incluyendo buspirona, diazepam, difenhidramina, etanol, haloperidol y pentobarbital. Para ello se realizaron las curvas dosis-respuesta del efecto sedante de la combinación entre hesperidina y cada uno de los fármacos antes mencionados, con las dosis totales indicadas en el **Cuadro 7**, a las proporciones 1:1, 1:3 y 3:1. Estas curvas se utilizaron posteriormente para determinar la DE_{50} de cada combinación, Z_{exp} , (**Cuadro 11**) que posteriormente se utilizó para el análisis isoblográfico.

Cuadro 11. Valores de Z_{ad} y $Z_{exp} \pm EEM$ para la administración conjunta de hesperidina y los diferentes fármacos depresores del SNC en diferentes proporciones.

Combinación	Proporción	$Z_{ad}(mg/kg)$	$Z_{exp} (mg/kg)$	Magnitud de la interacción ^a
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*

^a. 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

Los análisis isoblográficos de la combinación entre el flavonoide hesperidina y cada uno de los siguientes fármacos depresores del SNC, buspirona (**Figura 11**), diacepam (**Figura 12**), etanol (**Figura 13**), haloperidol (**Figura 14**) o difenhidramina (**Figura 15**) indican una relación de tipo aditiva. La magnitud de la interacción para cada una de las combinaciones antes mencionadas a las proporciones evaluadas (1:1, 3:1 y 1:3) no fue significativamente diferente de uno, lo que indica que no hubo una interacción entre los fármacos. (**Cuadro 11**).

En todos los isoblogramas presentados a continuación los círculos representan los puntos teóricos (Z_{ad}) y los triángulos representan los puntos experimentales (Z_{exp})

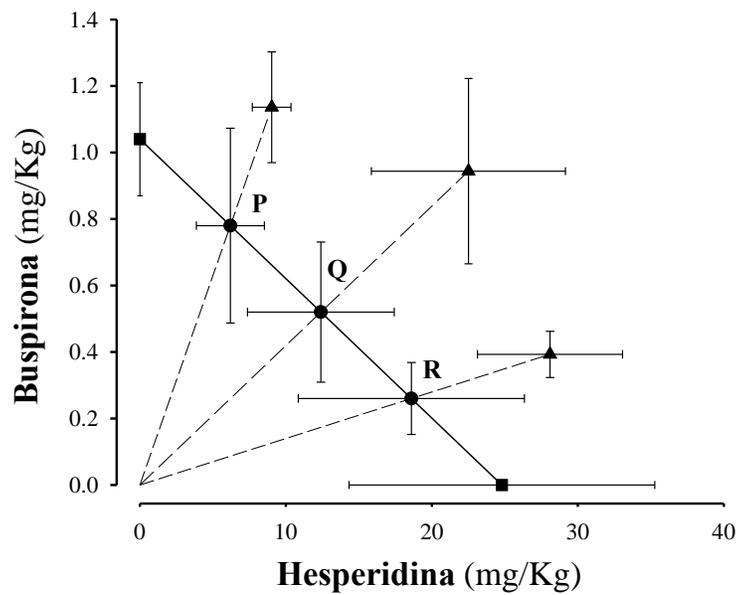


Figura 11. Isoblograma que muestra la interacción entre buspirona y el flavonoide hesperidina, en ratones machos ICR, en tres diferentes proporciones: P (3:1), Q (1:1) R (1:3). Los círculos representan los puntos teóricos y los triángulos representan los puntos experimentales. La interacción es de tipo aditiva.

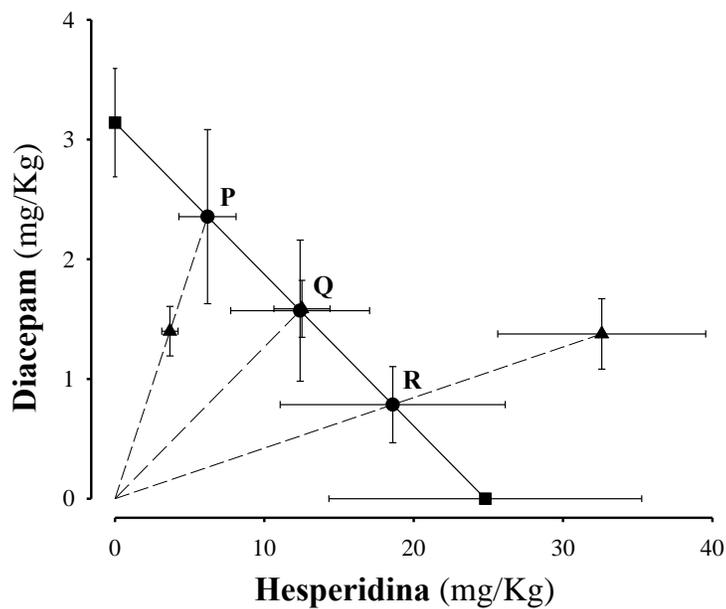


Figura 12. Isoblograma que muestra la interacción entre diazepam y el flavonoide hesperidina, en ratones machos ICR, en tres diferentes proporciones: P (3:1), Q (1:1) R (1:3). Los círculos representan los puntos teóricos y los triángulos representan los puntos experimentales. La interacción es de tipo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

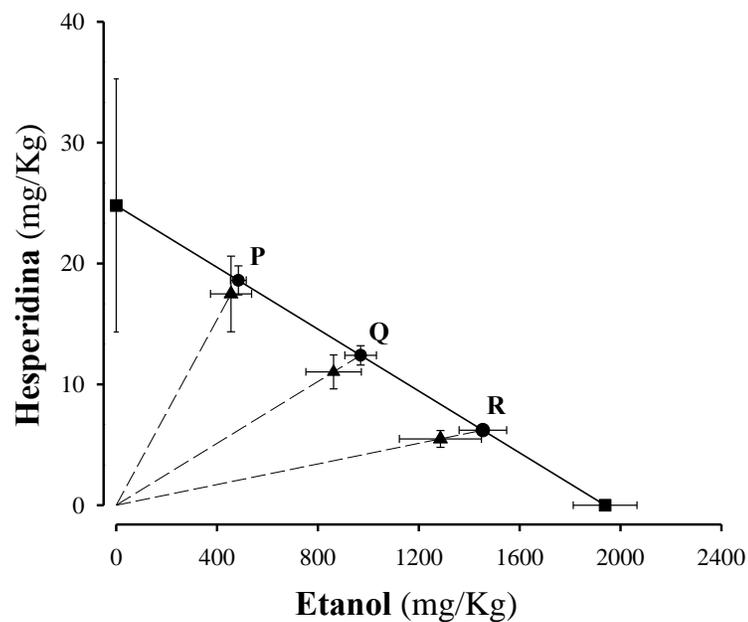


Figura 13. Isoblograma que muestra la interacción entre etanol y el flavonoide hesperidina, en ratones machos ICR, en tres diferentes proporciones: P (3:1), Q (1:1) R (1:3). Los círculos representan los puntos teóricos y los triángulos representan los puntos experimentales. La interacción es de tipo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

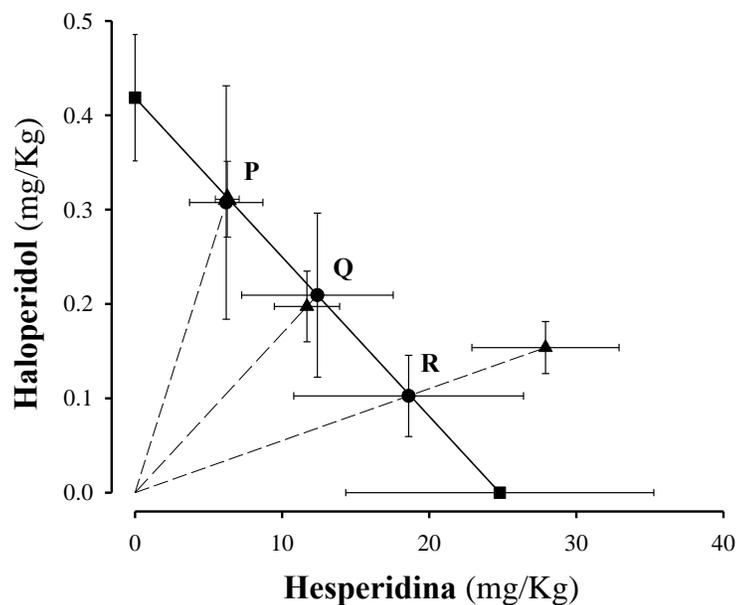


Figura 14. Isoblograma que muestra la interacción entre haloperidol y el flavonoide hesperidina, en ratones machos ICR, en tres diferentes proporciones: P (3:1), Q (1:1) R (1:3). Los círculos representan los puntos teóricos y los triángulos representan los puntos experimentales. La interacción es de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

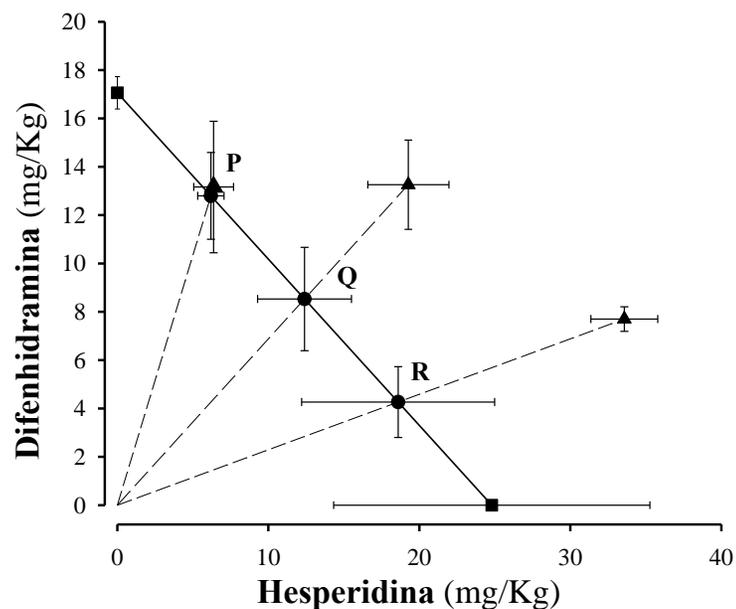


Figura 15. Isoblograma que muestra la interacción entre difenhidramina y el flavonoide hesperidina, en ratones machos ICR, en tres diferentes proporciones: P (3:1), Q (1:1) R (1:3). Los círculos representan los puntos teóricos y los triángulos representan los puntos experimentales. La interacción es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

Cuando se co-administró el pentobarbital con la hesperidina (**Figura 16**) en la 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 $Z_{exp} = 61.19 \pm 9.29$) (**Cuadro 12**).

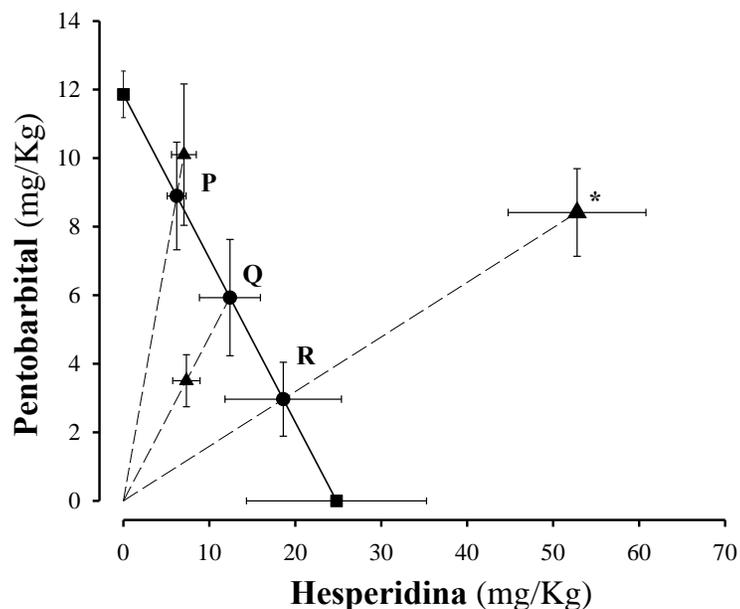


Figura 16. Isoblograma que muestra la interacción entre pentobarbital y el flavonoide hesperidina en ratones machos ICR, en tres diferentes proporciones: P (3:1), Q (1:1) R (1:3). Los círculos representan los puntos teóricos y los triángulos representan los puntos experimentales. La interacción es de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

Se llevó a cabo la evaluación de la actividad sedante de la hesperetina, aglicona de la hesperidina, glucohesperetina y del derivado acetilado de la hesperidina, con el objetivo de conocer la importancia de los azúcares y los grupos fenólicos libres de la molécula líder o prototipo. Las DE_{50} se presentan en el **Cuadro 12**.

Cuadro 12. Evaluación de la actividad sedante y de cuatro compuestos relacionados estructuralmente, utilizando el modelo de cilindro de exploración.

Sustancia	$DE_{50} \pm EEM$ (mg/Kg)*	Estructura
-----------	----------------------------	------------

Hesperetina	NA	
-------------	----	--

*Los datos corresponden a seis repeticiones. DE_{50} - Dosis efectiva 50. EEM- Error estándar de la media. NA-No activo.

Cuadro 12. Evaluación de la actividad sedante y de cuatro compuestos relacionados estructuralmente, utilizando el modelo de cilindro de exploración

Sustancia	DE ₅₀ ± EEM (mg/Kg)*	Estructura
Glucohesperetina	104.93 ± 25.73	
Hesperidina	24.88 ± 10.47	
Hesperidina acetilada	124.22 ± 25.13	
Difenhidramina	17.06 ± 0.67	

*Los datos corresponden a seis repeticiones. DE₅₀- Dosis efectiva 50. EEM- Error estándar de la media.

Ante la inquietud de saber la capacidad de la hesperidina, el derivado acetilado de hesperidina, la glucohesperetina y la hesperetina de atravesar la barrera hematoencefálica, en este trabajo se determinó su permeabilidad en monocapas de la línea MDR MDCK. De manera adicional, también se evaluó la permeabilidad de los flavonoides antes mencionados en monocapas de células Caco-2, que simulan la barrera intestinal.

En primer lugar se desarrolló un método analítico por HPLC para cuantificar los cuatro compuestos en mezcla (**Figura 17**), sin embargo, por la insolubilidad del derivado acetilado de la hesperidina en el medio de transporte se descartó su evaluación.

Se determinó la pureza, el tiempo de retención y la longitud máxima de absorción de cada uno de los tres compuestos a evaluar por separado. Las muestras se inyectaron en solución metanólica a una concentración de 200 µM. Los resultados fueron los siguientes:

- ✓ Hesperetina (pureza: 97.66 %): λ 286 nm, tiempo de retención 9.62 min.
- ✓ Glucohesperetina (pureza: 86.56%): λ 283 nm, tiempo de retención 7.25 min.
- ✓ Hesperidina (pureza: 94.26%): λ 283 nm, tiempo de retención 6.8 min (*Citrus sinensis*).

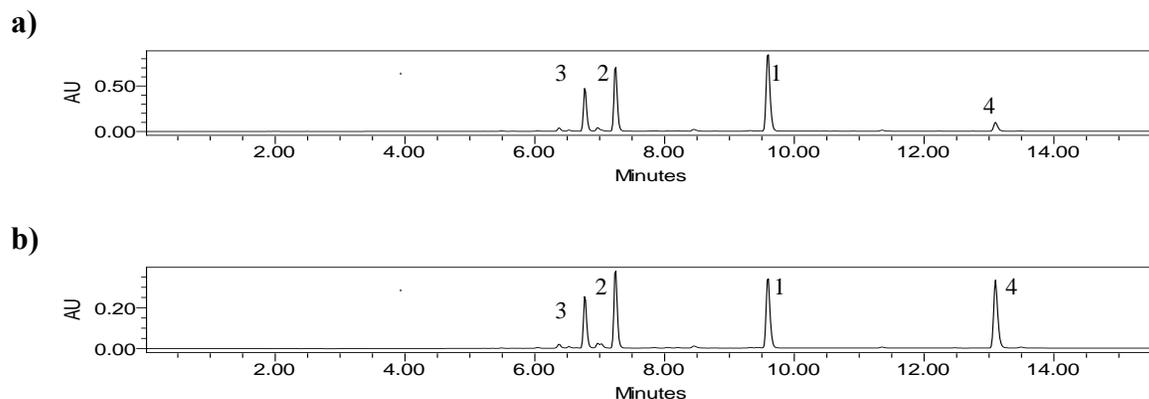


Figura 17. Cromatograma de la mezcla de hesperetina (1), glucohesperetina (2), hesperidina (3) y acetilhesperidina (4). Los compuestos fueron inyectados en solución metanólica a una concentración de 200 μ M. (a) Cromatograma a la longitud de onda de 284 nm. (b) Cromatograma a la longitud de onda de 268 nm.

El rango lineal (0.5-100 μ g/mL) y el límite de detección (50 ng/mL) fueron los mismos para los tres compuestos en el método analítico desarrollado.

Debido a que los experimentos de permeabilidad tienen una duración de 2 horas, se determinó que los tres flavonoides a evaluar son estables en el medio de transporte durante cuatro horas a 37 °C.

Durante el desarrollo de este trabajo apareció publicado en línea un artículo (Kobayashi *et al.*, 2008) sobre la evaluación de la permeabilidad de la hesperidina y hesperetina en la línea celular Caco-2, en dicho trabajo evaluaron la permeabilidad de ambos flavonoides a pH 7 y pH 6, por lo tanto, se decidió también evaluar la permeabilidad de los dos flavonoides en medio de transporte a pH 6 para comparar nuestros resultados con los ya publicados.

Los resultados que se obtuvieron en los experimentos de permeabilidad para los flavonoides evaluados en las líneas celulares Caco-2 y MDR MDCK se muestran en los **Cuadros 13 y 14** respectivamente.

Cuadro 13. Resultados de permeabilidad de hesperetina, glucohesperetina y hesperidina a través de las monocapas de la línea celular Caco-2.

Compuesto (200 µM)	Papp (x 10⁻⁶) ± DS	
Caco-2 Transporte A-B	pH 7	pH 6
Hesperetina	9.4 ± 0.09	13 ± 2.5
Glucohesperetina	0.38 ± 0.0003	0.43 ± 0.03
Hesperidina	DUL	0.97 ± 0.05
Propranolol	16 ± 1.6	
Atenolol	0.9 ± 0.22	
Caco-2 Transporte B-A	pH 7	pH 7
Hesperetina	9.6 ± 0.38	9.5 ± 1.36
Glucohesperetina	0.23 ± 0.07	0.77 ± 0.14
Hesperidina	1.6 ± 0.18	1.0 ± 0.17
Propranolol	34 ± 3.3	
Atenolol	3.5 ± 1.1	
	Radio de eflujo	Radio de eflujo
Hesperetina	1.010	0.764
Glucohesperetina	20.608	2.264
Hesperidina	-	1.686
Propranolol	2.125	
Atenolol	3.889	

DS- Desviación estándar, **DUL-** Detectable no cuantificable, **Papp-**Permeabilidad aparente.

Cuadro 14. Resultados de permeabilidad de hesperetina, glucohesperetina y hesperidina a través de las monocapas de la línea celular MDR-MDCK.

Compuesto (200 µM)	Papp (x 10⁻⁶) ± DS		Radio de eflujo
MDR-MDCK	Transporte A-B	Transporte B-A	
Hesperetina	4.9 ± 0.42	15 ± 0.39	3.017
Glucohesperetina	1.6 ± 0.025	2.8 ± 0.23	1.764
Hesperidina	DUL	2.7 ± 0.08	-
Cafeína (50 µM)	18 ± 1.30	19.9 ± 0.2	2.278
Atenolol (50 µM)	0.28 ± 0.01	1.8 ± 0.09	6.429

DS- Desviación estándar, **DUL-** Detectable no cuantificable, **Papp-**Permeabilidad aparente

VIII. DISCUSIÓN

Para el tratamiento del insomnio, así como de muchos otros padecimientos, además de la medicina alópata, existen una serie de tratamientos alternativos, tanto farmacéuticos como no farmacéuticos. Entre ellos encontramos el uso de plantas medicinales, utilizadas por casi todas las culturas desde tiempo remotos. Una de las medicinas herbolarias más reconocidas en el mundo es la Mexicana, sin embargo, esta riqueza cultural aún no es aprovechada eficientemente.

En este trabajo la evaluación de la actividad sedante de los diferentes extractos, fármacos o combinaciones de fármacos se llevó a cabo utilizando el modelo de cilindro de exploración. Como se mencionó en los antecedentes, está reportado que la disminución de la actividad motora y en especial la disminución en el número de levantamientos de un animal de experimentación, producida por una sustancia evaluada, con respecto a un control, está directamente relacionado con la actividad sedante de dicha sustancia (Ayoka *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2000; Marder *et al.*, 2003; Rolland *et al.*, 1991; Ugalde *et al.*, 2005). Por lo tanto, el cilindro de exploración es un modelo adecuado para determinar la actividad sedante de una sustancia.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el cernimiento inicial y tomando en cuenta que las especies *Galphimia glauca* y *Cymbopogon citratus* ya tienen algunos estudios sobre su actividad en el sistema nervioso central (Tortoriello and Lozoya, 1991; Tortoriello and Ortega, 1993; Carlini *et al.*, 1986; Lorenzetti *et al.*, 1991; Viana *et al.*, 2000), se decidió enfocar el trabajo a la especie *Citrus sinensis* y en específico a las flores, ya que no contaban con estudios químicos o farmacológicos.

Por medio del estudio biodirigido del extracto metanólico de las flores *C. sinensis* fue identificada la flavanona hesperidina, como el principio activo mayoritario de este remedio vegetal, comúnmente utilizado en México para el tratamiento del insomnio. Cabe resaltar, que hesperidina ya había sido reportada como principio activo sedante en *Valeriana officinalis* y *V.*

wallichii (Marder *et al.*, 2003), especies reconocidas mundialmente por su actividad a nivel de sistema nervioso central. El estudio de Marder y colaboradores (2003) se llevó a cabo utilizando el modelo de tablero con hoyos en ratones, estos investigadores relacionaron directamente la disminución del número de levantamientos de los animales con la actividad sedante de la hesperidina. En el mismo estudio, la hesperidina no disminuyó el tiempo de permanencia de los ratones en los brazos abiertos en el modelo de cruz elevada, parámetro que es relacionado directamente con una actividad ansiolítica (Marder *et al.*, 2003). Pero a pesar de que ya se había iniciado la exploración del mecanismo de acción sedante de hesperidina, éste aún no ha sido elucidado completamente (Fernández *et al.*, 2006; Loscalzo *et al.*, 2008). Por lo tanto, se llevó a cabo la exploración del mecanismo de acción de hesperidina.

Como se mencionó en el marco teórico, existen diversos sistemas de neurotransmisores, neuromoduladores y hormonas que participan en el ciclo sueño-vigilia (Alóe *et al.*, 2005; Datta y MacLean, 2007; Mignot *et al.*, 2002), por lo tanto, hay diferentes blancos farmacológicos en los cuales puede actuar una sustancia sedante. Para explorar el mecanismo de acción se llevaron a cabo experimentos en donde se administró de manera conjunta la hesperidina con fármacos agonistas y antagonistas de diferentes receptores que se encuentran en el SNC y que participan en el ciclo sueño-vigilia.

Está reportado que la medetomidina, agonista a los receptores α_2 , induce sedación e hipotermia en ratones (Haapalinna *et al.*, 1997). En este trabajo la participación de los receptores α_2 quedó descartada, porque al evaluar la actividad sedante de la hesperidina en presencia de yohimbina, un antagonista de los receptores α_2 adrenérgicos, se observó que se potenció el efecto sedante de la hesperidina (**Figura 8**), por otra parte, la clonidina, un agonista de los receptores α_2 adrenérgicos, no modificó la actividad sedante de la hesperidina, lo cual sugiere que el efecto que produjo la yohimbina sobre la acción de la hesperidina no se debió a su interacción sobre los receptores α_2 . Resultados similares se reportaron para la yohimbina en el modelo de estrés por el paradigma de separación en polluelos. También está reportado que la yohimbina eleva los niveles centrales de dopamina y disminuye la velocidad de recambio central de serotonina en ratas, también se ha determinado por experimentos de unión-ligando al receptor que la yohimbina puede interactuar con los receptores 5-HT_{1A}

(Haapalinna *et al.*, 1997). Por lo tanto, la afinidad de yohimbina por los receptores 5-HT_{1A}, podría explicar la potenciación que produce de la actividad sedante de la hesperidina. Por lo que se decidió evaluar el efecto sedante de la hesperidina en presencia de haloperidol (antagonista de los receptores D₂) y bupirona (agonista de los receptores 5-HT_{1A}). Por un lado, la bupirona incrementó el efecto sedante de la hesperidina (**Figura 8**), mientras que el haloperidol no lo modificó. Los resultados anteriores sugirieron la participación de los receptores 5-HT_{1A} en el mecanismo de acción de la hesperidina. Por lo que para tener más evidencias experimentales que sustenten esta propuesta, se evaluó el efecto de WAY 100635, un antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{1A} (Fornal *et al.*, 1996), sobre la actividad sedante de la hesperidina, esperando que WAY 100635 revirtiera la actividad. Sin embargo, este fármaco no produjo el cambio esperado. Además, la disminución en la síntesis de serotonina producida por *p*-clorofenilalanina (PCPA) (Go Hui y Chan, 1995) no alteró la actividad de la hesperidina, por lo tanto se determinó que la hesperidina no actúa sobre la vía serotoninérgica.

Como se describió anteriormente, la actividad sedante de la hesperidina se potenció con yohimbina y bupirona, estos dos fármacos tienen en común que disminuyen los niveles de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) (Kuno *et al.*, 1990; Pauwels *et al.*, 1993). Así pues se esperó que la forskolina, un activador de la enzima adenilato ciclasa (encargada de sintetizar al AMPC) (Ogasahara *et al.*, 1981) y la aminofilina, un inhibidor inespecífico de fosfodiesterasas con una débil actividad sobre los receptores de adenosina (Barnes 1998), modificaran la actividad de hesperidina. Sin embargo, sólo la aminofilina revirtió el efecto sedante de la hesperidina (**Figura 9**), pero rolipram, un inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa tipo 4, con acción en el SNC (Orallo *et al.*, 2004; Zhang y O'Donnell, 2000), no modificó el efecto de hesperidina. Por el contrario, la cafeína, un antagonista de los receptores de adenosina sin efecto específico sobre las fosfodiesterasas a nivel central (Nehlig *et al.*, 1992), revirtió el efecto sedante de hesperidina (**Figura 9**). Estos resultados sugirieron que la hesperidina podría estar actuando sobre los receptores de adenosina. Para apoyar esta propuesta se evaluó la actividad de la hesperidina en presencia de la 1,3-dimetil-8-fenilxantina, un antagonista más selectivo que aminofilina y cafeína de los receptores de adenosina (Fredholm y Persson, 1992). La 1,3-dimetil-8-fenilxantina revirtió el efecto sedante de la hesperidina (**Figura 10**) a

dosis más bajas que las necesarias para inhibir el efecto sedante de NECA (5'-N-etilcarboxamidoadenosina) (**Figura 10**), un agonista de los receptores de adenosina (Sato *et al.*, 1998). Se evaluó el efecto de la 1,3-dimetil-8-fenilxantina sobre la actividad de la hesperidina, a un rango mayor de dosis (10, 30 y 54.7 mg/Kg), debido a que éste fármaco es un antagonista más selectivo de los receptores de adenosina. Estos resultados sugieren que la hesperidina ejerce su efecto sedante como agonista de los receptores de adenosina, A₁ o A_{2A}. Los receptores A₁ como los A_{2A} están involucrados en el proceso del sueño, la activación de los receptores A₁ en el ante cerebro basal por agonistas promueve el sueño, mientras que la activación de los receptores A_{2A} en el núcleo preóptico ventrolateral y posteriormente vía proyecciones gabaérgicas inhibe la actividad del núcleo tuberomammilar y otras áreas involucradas en el despertar. Más aún, se sabe que la activación del receptor A₁ produce la inhibición de la adenilato ciclasa y por lo tanto disminuyen los niveles de AMPc (Basheer *et al.*, 2004), mismo efecto que producen la yohimbina y bupiriona. Los resultados de este estudio contrastan con los reportados por Marder y colaboradores (2003), quienes reportan que la hesperidina no es ligando de los receptores A₁ en membranas de corteza cerebral de rata. Sin embargo, los resultados obtenidos en la corteza cerebral no necesariamente tienen que ser los mismos en el cerebro anterior basal o en el espacio subaracnoideo, debajo del cerebro anterior basal rostral, lugares donde la adenosina se une a los recetores A₁ y A_{2A} respectivamente, para inducir sueño. La acción de la hesperidina sobre los receptores de adenosina esta de acuerdo con el efecto opuesto que se observa con el consumo de bebidas como café y té. Estas bebidas mantienen despiertas a las personas y contienen compuestos antagonistas a los receptores de adenosina como son cafeína y teobromina. Además, esta reportado que algunos flavonoides son ligandos de los receptores A₁ de adenosina (Ingkaninan *et al.*, 2000) y que la administración de quercetina en hombres incrementa los niveles de adenosina en plasma (Bardi *et al.*, 1999)

Los receptores colinérgicos, β -adrenérgicos y el sitio de unión de las benzodiazepinas se descartaron como posibles blancos farmacológicos de la hesperidina debido a que el pretratamiento con atropina, haloperidol o flumacenil no modificaron el efecto sedante de la hesperidina (**Cuadro 10**).

Los estudios de interacción entre productos naturales y fármacos *in vivo* 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.

Como se mencionó en los antecedentes, la identificación y separación de los componentes activos de una planta medicinal puede simplificar los estudios de interacción, sin dejar a un lado que la mezcla de todos los componentes puede modificar los resultados. Otro punto importante, es que el análisis isobolográfico es una herramienta que proporciona información acerca del mecanismo de acción de un compuesto. Por lo tanto, se decidió evaluar el efecto de la administración conjunta de la hesperidina, con cada uno de seis fármacos depresores del SNC: buspirona, diacepam, haloperidol, difenhidramina, etanol y pentobarbital

El análisis isobolográfico de la administración conjunta de hesperidina con buspirona, a las tres diferentes proporciones evaluadas, determinó que el efecto resultante es de carácter aditivo. (**Cuadro 11**).

En los experimentos realizados para elucidar el mecanismo de acción de la hesperidina, la buspirona potenció el efecto sedante de hesperidina, por lo tanto se pensó que la hesperidina podría estar actuando a través de los receptores de serotonina 5HT_{1A}, pero experimentos posteriores indicaron que no. Con estos estudios de interacción se confirmó que el efecto entonces observado fue aditivo.

El isoblograma de la combinación del diacepam con la hesperidina (**Figura 12**), muestra que su relación es de tipo aditiva. Fernández y colaboradores (2005), reportaron que existe una interacción de tipo sinergista entre la hesperidina y diacepam en una combinación 1:13, sin embargo, en este trabajo se demuestra que a tres diferentes proporciones (1:1, 1:3 y 3:1) no existe tal interacción. La relación que se presentó entre la hesperidina y el diacepam fue solamente de carácter aditivo. Marder y colaboradores (2003) determinaron que la hesperidina no es ligando del sitio de unión de benzodiazepinas, lo cual concuerda con no encontrar ningún tipo de interacción entre el diacepam y la hesperidina en este trabajo. Además, en este

trabajo se utilizó el flumacenil (antagonista del sitio de unión de las benzodicepinas) en uno de los experimentos realizados para elucidar el mecanismo de acción de la hesperidina y este fármaco no afectó el efecto sedante de hesperidina en ese caso tampoco hubo evidencias experimentales para proponer que la hesperidina actuara vía sitio de unión de las benzodicepinas.

En el caso del análisis isobolográfico entre etanol y hesperidina se determinó que la relación es de tipo aditivo para las tres proporciones estudiadas (**Cuadro 11**). Cuando se administró una dosis de etanol de 5816.44 mg/kg y hesperidina de 24.8 mg/kg (de la proporción etanol:hesperidina 3:1), los animales murieron después de una hora de la administración. A pesar de que fue posible realizar la evaluación en el cilindro de exploración, después de observar que los animales morían, se decidió no tomar en cuenta los datos de esta última dosis, pues no podíamos asegurar que el efecto observado fue sedante o se debió a un efecto tóxico del alcohol a altas dosis (Gillian, 1985; Kalant y Khanna, 2002; Lieber 1997).

El análisis isobolográfico de las combinaciones de la difenhidramina con la hesperidina (**Figura 15**) dio como resultado una relación aditiva entre estos dos fármacos. 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 respectivamente, los animales presentaron movimientos anormales de tipo convulsivo, por lo que ésta dosis se descartó para el cálculo de DE_{50} , ya que el efecto que se observó no fue sedante. Los efectos convulsivos observados despiertan interés ya que 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 medios de transporte (Bender *et al.*, 2003; Kadar, 2002). También 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). Aunado a esto, la hesperidina es un flavonoide natural que se encuentra en los cítricos, y forma parte de la dieta habitual de las personas (Garg *et al.*, 2001).

Cuando se co-administró el pentobarbital con la hesperidina en mayor proporción (1:3), la interacción resultó subaditiva ($Z_{ad} = 21.56 \pm 7.85$ y $Z_{exp} = 61.19 \pm 9.29$).

El flavonoide hesperidina se encuentra presente en *Valeriana officinalis* y *V. wallichii* (Marder *et al.*, 2003), por lo que no se descarta que también se encuentre presente en otras especies de valeriana. Si asumimos éste hecho, la interacción subaditiva encontrada entre el pentobarbital y la hesperidina en este trabajo se encuentra en armonía con los estudios de Ugalde y colaboradores (2005), quienes determinaron que la co-administración del extracto hidroalcohólico de *Valeriana procera* y el pentobarbital, en una proporción 1:1 provocó una interacción igualmente subaditiva.

Se ha demostrado que la hesperidina tiene efecto sedante (Marder *et al.*, 2003), sin embargo, no existían informes, con excepción de diacepam (Fernández *et al.*, 2005), de estudios de interacción entre la hesperidina y otros fármacos depresores del SNC. El hecho de encontrar efectos aditivos entre la hesperidina y varios fármacos depresores del SNC indica que los fármacos actúan por mecanismos parecidos, pero no necesariamente sobre el mismo receptor (Tallarida, 2000).

Otro punto que abarcó el desarrollo de este proyecto fue la exploración de la importancia de los azúcares unidos a hesperetina, glucohesperetina (glucósido de hesperetina), hesperidina (rutinósido de hesperetina) y el derivado acetilado de hesperidina, en referencia a su actividad sedante. Los resultados indican (**Cuadro 12**) que cuando la hesperetina tiene unida una molécula de glucosa, presenta actividad sedante baja y cuando la glucohesperetina tiene unida una molécula de ramnosa, para formar el rutinósido, la actividad sedante aumenta. Sin embargo, la aglicona no presentó actividad sedante. Además, está reportado que cuando el glicósido no tiene un arreglo de los azúcares $\alpha 1 \rightarrow 6$ (rutinósido), la actividad de la molécula decrece como sucede en el caso de la neohesperidina ($\alpha 1 \rightarrow 2$, neohesperósido) (Marder *et al.*, 2006). Considerando lo anterior, para que la molécula tenga actividad sedante no sólo es importante su unión a dos azúcares (glucosa y ramnosa), sino también es importante cómo se encuentran unidos estos azúcares.

Por otra parte, se formó el derivado acetilado de la hesperidina con la finalidad de reducir la polaridad de la molécula y así aumentar su liposolubilidad para lograr que se absorba mejor y se incremente la actividad, sin embargo, el derivado acetilado presentó menor actividad sedante que la hesperidina, por lo que se puede concluir que los grupos hidroxilos libres son necesarios para que la molécula tenga mayor actividad sedante.

Se llevó a cabo la evaluación de la permeabilidad a través de monocapas de las líneas celulares Caco-2 y MDR MDCK de los compuestos: Hesperetina, glucohesperetina y hesperidina.

Para poder analizar los resultados de los experimentos de permeabilidad es importante tomar en cuenta la siguiente información: Los coeficientes de permeabilidad aparente (Papp) en Caco-2 reportados para diferentes compuestos, con una variedad estructural se encuentra en un rango de 5×10^{-8} a 5×10^{-5} cm/s y que tienen una absorción en humanos de 0 % a 100 %. Muchos autores han reportado que los fármacos que se absorben totalmente en el intestino humano deben tener Papp por arriba de 1×10^{-6} cm/s. Por otra parte en el caso de la línea celular MDR-MDCK se ha propuesto que valores de Papp por arriba de 3×10^{-6} cm/s indican que pueden llegar al sistema nervioso central. Otro punto reportado para ambas líneas celulares es que cuando el radio de flujo es 1 o muy cercano a 1 indica que los compuestos se transportan por difusión pasiva, en cambio cuando el valor se encuentra por arriba de 2 indica que algún sistema de transporte está involucrado (Madgula *et al.*, 2007).

Los valores de Papp obtenidos para la hesperetina (**Cuadros 14 y 15**), indican que este flavonoide se absorbería en el intestino eficientemente por difusión pasiva y posteriormente podría atravesar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, está reportado que la administración intraperitoneal de la hesperetina en ratones, no produce efecto sedante (Fernández *et al.*, 2006). Además en el estudio realizado con el modelo de cilindro de exploración, durante el desarrollo de este proyecto, quedó demostrado que la hesperetina no tiene actividad sedante (evaluado hasta 300 mg/Kg) en ratones ICR. En cambio la hesperidina, que presentó una permeabilidad muy pobre en las monocapas de Caco-2 y MDR-MDCK (**Cuadros 14 y 15**), tuvo una mayor actividad sedante. La aparente contradicción de estos resultados podrían explicarse del hecho de que en nuestros experimentos *in vivo*, utilizando el

modelo de cilindro de exploración, los flavonoides fueron administrados a los ratones por vía intraperitoneal. Pero, si bien la administración intraperitoneal de las sustancias se utiliza para determinar su efecto agudo y no toma en cuenta el proceso de absorción intestinal, los experimentos *in vivo* con animales siguen siendo una de las mejores herramientas con los que cuentan los experimentadores para predecir la actividad en humanos.

En el caso de la glucohesperetina no se había hecho ningún estudio de permeabilidad, y en los ensayos realizados presentó baja permeabilidad en ambas líneas celulares (**Cuadros 14 y 15**), además, de acuerdo al radio de flujo, el paso a través de las monocapas fue por difusión pasiva, aún así, su permeabilidad fue mayor a la que tiene la hesperidina, el flavonoide evaluado con mayor actividad sedante. Cabe mencionar que cuando se realizó el análisis de por HPLC de las muestras resultantes de glucohesperetina, se encontró la presencia de hesperetina, indicando que una parte del compuesto es hidrolizado.

Como se mencionó anteriormente, al inicio de la ejecución de los ensayos de permeabilidad, fue publicado un estudio del transporte de hesperidina y hesperetina a través de monocapas de la línea celular Caco-2 (Kobayashi *et al.*, 2008). En ese estudio utilizaron ambos compuestos a una concentración mayor (500 μM) que la que se utilizó en este estudio (200 μM), además la densidad celular a la que sembraron las células (1×10^5 células/cm²) también fue diferente (63 000 células/cm²). Kobayashi y sus colaboradores encontraron que el transporte de la hesperidina desde el compartimento apical hacia el basolateral es por difusión pasiva, que es la misma conclusión que obtuvimos en este estudio. Además, en el estudio de Kobayashi determinaron que el flujo de hesperidina a través de las monocapas de Caco-2, en presencia o ausencia de un gradiente protón esta inversamente relacionado con los valores de TEER. Los valores de TEER están directamente relacionados con la integridad de una monocapa, ya que entre mayor sea este valor indica que las uniones entre células son más estrechas, por el contrario, un valor bajo de TEER indica que posiblemente la monocapa se encuentra fracturada, o simplemente no se formó. Por lo tanto, el estudio de Kobayashi indica que entre más estrechas sean las uniones entre las células de la monocapa, menor es la cantidad de hesperidina que atraviesa la membrana, por el contrario, cuando la monocapa es menos compacta la hesperidina tiene más espacios intercelulares por donde pasar. Por otra parte, en el

mismo estudio de Kobayashi y sus colaboradores, la hesperetina presentó una velocidad de permeabilidad, en presencia de gradiente de protón, del compartimento apical al basal, 5 veces más grande que en sentido opuesto. Por el contrario, en ausencia de un gradiente de protón la velocidad de permeabilidad de hesperetina en ambos sentidos fue para aproximadamente la mitad que en presencia de gradiente de protón. Estos datos indicaron que el transporte de hesperetina esta acoplado a un transporte de protón. En este estudio si bien el gradiente de protón aumentó la cantidad de hesperetina transportada no lo hizo de manera considerable, de tal que en radio de flujo continua indicando que la hesperetina atraviesa la membrana también por difusión pasiva, las diferencias en los resultados pueden deberse a las diferentes condiciones experimentales.

Resultados contrarios a los publicados por Kobayashi y sus colaboradores, se reportaron en otro estudio donde también realizaron ensayos de permeabilidad en monocapas de células Caco-2 con la hesperetina y la hesperidina (Serra *et al.*, 2008), en ese estudio encontraron que la hesperidina no se absorbe y que la hesperetina atraviesa la monocapa solo por difusión pasiva, no por otro sistema de transporte como proponen Kobayashi y su grupo de investigación.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la hesperidina tiene pobre permeabilidad y la poca cantidad de este compuesto que atraviesa las monocapas de Caco-2 lo hace por difusión pasiva. Por otra parte, otro estudio indica que la mezcla de hesperidina con algunos glucósidos de hesperidina (formados por acción de la enzima glucanotrasferasa) cruza la monocapa de caco-2 también lo hace por difusión pasiva (Kim *et al.*, 1999).

El metabolismo y la absorción intestinal determinan la biodisponibilidad de los flavonoides así como de todas las sustancias, sin embargo, los estudios indican que es baja para este tipo de compuestos. Generalmente los flavonoides son absorbidos por difusión pasiva (Kobayashi *et al.*, 2008; Kobayashi y Konishi, 2008). Por otra parte las agliconas de diferentes isoflavonas son transportadas al interior de los enterocitos más efectivamente que sus respectivos glucósidos, porque las agliconas generalmente son más liposolubles y por lo tanto es más fácil su absorción. Lo mismo parece ocurrir con el transporte de la quercetina y sus glucósidos,

ninguno los glucósidos evaluados pasan más eficientemente por la monocapa de Caco-2 que la aglicona, además parte de los glucósidos que son absorbidos son transformados a metabolitos conjugados antes de entrar a la circulación general (Murota *et al.*, 2000). Ante la evidencia es muy factible proponer que la hidrólisis de los glucósidos es requerida para su absorción en el tracto intestinal.

Hay dos hipótesis concernientes a la absorción de glucósidos en el intestino delgado. Primero, el glucósido puede ser hidrolizado por la enzima lactasa florizin hidrolaza y después la aglicona difunde a través de las células epiteliales por difusión pasiva. De manera alternativa, la molécula de glucósido puede ser transportada por el transportador de glucosa SGLT1 y después desglucosilado por la enzima β -glucosidasa, enzima presente en las células intestinales (Nielsen *et al.*, 2006).

Ante todas las evidencias, podría proponerse que la hesperidina aún absorbiéndose en cantidades mínimas llegaría al sistema nervioso central y ejercería su efecto sedante. Sin embargo, se requieren más estudios de transporte para la hesperidina *in vitro* e *in vivo* para esclarecer en que forma esta molécula llega al SNC y ejerce su efecto.

IX. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se desprenden de este trabajo son las siguientes:

- ❖ Después de realizar el cernimiento de la actividad sedante de varios extractos de diferentes especies de plantas utilizadas en México para aliviar el insomnio, el proyecto se enfocó al estudio del extracto metanólico de las flores de *Citrus sinensis*, por su actividad y por no contar con estudios químicos o farmacológicos.
- ❖ A través del estudio biodirigido del extracto metanólico de las flores de *Citrus sinensis* se identificó a la flavanona hesperidina como principio activo sedante de esta especie.
- ❖ Mediante la determinación de la actividad sedante de hesperidina en presencia de fármacos agonistas y antagonistas de diferentes receptores involucrados en el proceso del sueño, se determinó que en el mecanismo de acción sedante de la hesperidina están involucrados los receptores de adenosina.
- ❖ Mediante un análisis isoblográfico se determinó que la hesperidina no presenta interacción con buspirona, haloperidol, diacepam, difenhidramina y pentobarbital, con excepción de la combinación de hesperidina:pentobarbital 3:1, en el que se encontró interacción de tipo subaditivo.
- ❖ De la evaluación de la actividad sedante de la hesperetina, glucohesperetina y el derivado acetilado de la hesperidina, se determinó que para que la molécula tenga mayor actividad sedante es importante la presencia de los dos azúcares, glucosa y ramnosa, y de los hidroxilos libres.

-
- ❖ De acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos de permeabilidad *in vitro* con las líneas celulares Caco-2 y MDR-MDCK, es altamente probable que en el intestino la hesperidina se absorba poco y que la cantidad que atraviese la barrera hematoencefálica también sea poca, sin embargo, la cantidad que lograra atravesar las dos barreras sería suficiente para ejercer su actividad sedante.

 - ❖ Los resultados que se presentan en este trabajo proporcionan aportes importantes a la farmacología de la hesperidina y dan sustento al uso tradicional de las flores de azahar como agente inductor del sueño.

X. PERSPECTIVAS

Utilizar agonistas y antagonistas de los receptores A_1 y A_{2A} de adenosina, para determinar cual de los dos, o si ambos, están involucrados en el mecanismo de acción sedante del flavonoide hesperidina.

Utilizar agonistas y antagonistas a los receptores de adenosina para determinar la potencia relativa de hesperidina.

Realizar estudios computacionales que nos permitan obtener información acerca de cómo la hesperidina pudiera estar arribando al sistema nervioso central para poder discernir la aparente inconsistencia de los resultados experimentales *in vivo* con lo reportado para humanos.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Alóe, F., Pinto de Azevedo, A.P., Hasan, R. 2005. Sleep-wake cycle mechanisms. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 27, suplemento 1: 33-39.
- Álvarez, B.A., Ramón-Laca, L. 2005. Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 89-95.
- Avula B., Kumar U.S., Navarrete A., Khan I.A. 2005. Simultaneous quantification of adrenergic amines and flavonoids in *C. aurantium*, various citrus species and dietary supplements by liquid chromatography. *Journal of AOAC International* 88: 1593-1606.
- Attele A.S., Xie, J.T., Yuan, C.S. 2000. Treatment of insomnia: An alternative approach. *Alternative Medicine Review* 5: 249-259.
- Ayoka, A.O., Akomolafe, R.O., Iwalewa, E.O., Akanmu, M.A., Ukponmwan. 2006. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 103: 166-175.
- Balderas, J., Reza, V., Ugalde, M., Guzmán, L., Serrano, M., Aguilar, A., Navarrete, A. 2008. Pharmacodynamic interaction of the sedative effects of *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standl. With six central nervous system depressant drugs in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 119: 47-52.
- Barnes P.J. Pharmacology of airway smooth muscle. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 158: S123- S132.
- Basheer, R., Strecker, R.S., Thakkar, M.M., McCarley, R.W. 2004. Adenosine and sleep-wake regulation. *Progress in Neurobiology* 73: 379-396.
- Blardi P, De Lalla A, Volpi L, Di Perri T. 1999. Stimulation of endogenous adenosine release by oral administration of quercetin and resveratrol in man. *Drugs Experimental Clinical Research* 25: 105-110.
- Benca, R.M. 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.
- Berne, R.M., Levy, M.N. 2001. Funciones superiores del sistema nervioso. En: *Fisiología*. Harcourt. España. 142-144.
- Butterweck, V., Derendorf, H., Gaus, W., Nahrstedt, A., Schulz, V., Unger, M. 2004. Pharmacokinetic herb-drug interactions: are preventive screenings necessary and appropriate? *Planta Medica* 70: 784-791.
- Cáceres A., 1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria. Universidad de San Carlos de Guatemala. 283-286.
- Canals, J., Domenech, E., Carbajo, G., Blande, J. 1999. Prevalence of DSM-III-R and ICD-10 psychiatric disorders in a Spanish population of 18-year-olds. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 23: 237-241.
- Carlini, E.A., Contar, J. de D.P., Silva-Filho, A.R, Silveira-Filho, N.G, Frochtengarten, M.L, Bueno, O.F. 1986. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratos* Staff). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *Journal of ethnopharmacology* 17: 37-64.
- Charney, D., Mihic, S., Harris, R. 2001. Hypnotics and sedatives. En: J. Hardman, L. Limbird (Eds) A. Goodman. Goodman and Gilman. *The pharmacological basis of therapeutics*. MacGraw-Hill. USA. 399-427.
- Chavez, ML., Jordan, MA., Chavez, PI. 2006. Evidence-based drug-herbal interactions. *Life Sciences* 78: 2146-2157.
- Clement, J.A., Yoder, B.J., Kingston, D.G. 2004. Natural products as a Source of CNS-active agents. *Mini-review Organic Chemistry* 1: 183-208.
- Cajochen, C., Kräuchi, K., Wirz-Justice, A. 2003. Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep. *Journal of Neuroendocrinology* 15: 432-437.
- Datta, S., MacLean, R.R. 2007. Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep-wake behavior: reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 31: 775-824.

-
- Edinger, J.D., Means, M.K. 2005. Cognitive-behavioral therapy for primary insomnia. *Clinical Psychology Review* 25: 539-558.
- Estrada, E., Lara, A. 2008. Sistema nervioso y herbolaria. Universidad Autónoma de Chapingo. Fórmulas herbolarias ediciones. 116.
- Fernández, S.P., Wasowski, C., Loscalzo, L.M., Granger, R.E., Johnston, G.A.R., Paladini, A.C., Marder, M. 2006. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *European Journal of Pharmacology* 539: 168-176.
- Fernández, S.P., Wasowski, C., Paladini, A.C., Marder, M. 2005. Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam. *European Journal of Pharmacology* 512: 189-198.
- Font, P.Q. 1962. Plantas medicinales. El dioscórides renovado. Labor S.A. Barcelona. 436-438.
- Fornal, C.A., Metzler, C.W., Gallegos, R.A., Veasey, S.C., McCreary, A.C., Jacobs, B.L. 1996. WAY-100635, a potent and selective 5-hydroxytryptamine_{1A} antagonist, increases serotonergic neuronal activity in behaving cats: comparison with (S)-WAY-100135¹. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 278: 752-762.
- Fredholm BB, Persson CGA. 1982. Xantine derivatives as adenosine receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology* 81: 673-676.
- Fugh-Berman, A., Ernest, E. 2001. Herb-drug interactions: Review and assessment of reliability. *British Journal of Clinical Pharmacology* 52: 587-595.
- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L.J., Singla, A.K. 2001. Chemistry and Pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy research* 15: 655-669.
- Garzón-de la Mora, P., García López, P.M., García Estrada, J., Navarro-Ruíz, A., Villanueva-Michel, T., Villarreal-de Puga, L.M., Casillas-Ochoa, J., 1999. *Casimiroa edulis* seed extracts show anticonvulsive properties in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 68: 275-282.
- 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.
- Go, Siu-Chun., Chan, T. (1995). Mechanisms mediating N⁶-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypophagia in mice. *European Journal of Pharmacology* 283: 141-150.

-
- Goldman, R.D., Rogovik, A.L., Lai, D., Vohra, S. 2008. Potential interactions of drug-natural health products and natural health products-natural health among children. *The Journal of Pediatrics* 152: 521-526.
- Gottesmann, C. 2002. GABA mechanisms and sleep. *Neuroscience* 111: 231-239.
- Haapalinna, A., Viitamaa, T., MacDonald, E., Savola, J., Tuomisto, L., Virtanen, R., heinonen, E. 1997. Evaluation of the effects of a specific α_2 -adrenoceptor antagonist, atipamezole, on α_1 - and α_2 -adrenoceptor subtype binding, brain neurochemistry and behaviour in comparison with yohimbina. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 356: 570-582.
- Harris, D.L., DeLorey, T.M., He, X., Cook, J.M., Loew, G.H. 2000. Determinants of recognition of ligands binding to benzodiazepine receptors initiating sedation. *European Journal of Pharmacology* 401: 271-287.
- Harvey, A.G. 2001. Insomnia: symptom or diagnosis? *Clinical Psychology Review* 21: 1037-1059.
- Hiller K. y Zetler G. 1996. Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis* L.: Behavioural and anticonvulsant properties. *Phytotherapy Research* 10: 145-151.
- Hu, Z., Yang, X., Ho PC., Chan SY., Heng, PW., Chan, E., Duan, W., Koh, HL., Zhou, S. 2005. Herb-drug interactions. *Drugs* 65: 1239-1282.
- Ingkaninan K, IJzerman A, Verpoorte R. 2000. Leuteolin, a compound with adenosine A₁ receptor-binding activity, and chromone and dihydronaphthalenone constituents from *Senna siamea*. *Journal Natural Products* 63: 315-317.
- Instituto Nacional Indigenista. Flora medicinal indígena de México III. 1994. México.
- Izzo, AI. 2004. herb-drug interactions: an overview of the clinical evidience. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 19: 1-16.
- Kadar, D. 2002. Histamina y antihistamínicos. En: Kalant H., Roschlau, W. (Eds). *Principios de Farmacología Médica*. Oxford University Press. México. 403-412.
- Kalant, H., Khanma, J.M. 2002. Alcoholes. En: Kalant H., Walter, H., Roschlau, W. *Principios de farmacología médica*. Oxford University Press. México. 303-316.
- Kamel, N.S., Gammanck, J.K. 2006. Insomnia in the erderly: Cause, approach, and treatment. *The American Journal of Medicine* 119: 463-469.

-
- Kim, M., Kometani, T., Okada, S., Shimizu, M. 1990. Permeation of hesperidin glycosides across caco-2 cell monolayers via the paracellular pathway. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63: 2183-2188.
- Kimball, D.A. 2002. *Procesado de cítricos*. Acriba, S.A. España. 1-6.
- Kobayashi, S., Tanabe, S., Sugiyama, M., Konishi, Y. 2008. Transepithelial transport of hesperitin and hesperidin in intestinal caco-2 cell monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008: 33-41.
- Kobayashi, S., Konishi, Y. 2008. Transepithelial transport of flavanone in intestinal caco-2 cell monolayers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 368: 23-29.
- Kuno, N., Kamisaki, Y., Itoh, T. 1990. Inhibition of cyclic AMP accumulation by α_2 -adrenoreceptors in the rat cerebral cortex. *European Journal of Pharmacology* 176: 281-287.
- Leite, J.R., Seabra, M. de L, Maluf, E., Assolant, K., Suchecki, D., Tufik, S., Klepacz, S., Calil, H.M., Carlini, E.A. 1986. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Staff). III. Assessment of eventual toxic, hypnotic and anxiolytic effects on humans. *Journal of Ethnopharmacology* 17: 75-83.
- Lewin G., Bert, M., Dauguet, J., Schaeffer, C., Guinamant, J., Volland, J. 1989. Reduction de flavanones par le cyanoboro-hydrure de sodium dans l'acide trifluoroacétique – I. *Tetrahedron Letters* 30: 7049-1052.
- Li, C., Gu, H., Dou, H., Zhou. 2007. Identification of flavanones from peel of *Citrus changshan-huyou* Y.B. Chang, by HPLC-MS and NMR. *European Food Research Technology* 225: 777-782.
- Lieber, C. 1997. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clinica Acta* 257: 59-84.
- Lorenzetti, B.B., Souza, G.E., Sarti, S.J., Filho, D.S., Ferreira, S.H. 1991. Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. *Journal of Ethnopharmacology* 1991: 43-48.
- Loscalzo, L.M., Wasowski, C., Paladini, A.C., Marder, M. Opioid receptors are involved in the sedative and antinociceptive effects of hesperidin as well as in its potentiation with benzodiazepines. *European Journal of Pharmacology* 580: 306-313.

-
- Madgula, V.L., Avula, B., Reddy, N.V.L., Khan, I.A., Khan, S.I. 2007. Transport of decursin and decursinol angelate across Caco-2 and MDR-MDCK cell monolayers: *in vitro* models for intestinal and blood-brain barrier permeability. *Planta Medica* 73: 330-335.
- Marder, M., Viola, H., Wasowski, C., Fernández, S., Medina, J.H., Paladini, A.C. 2003. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacology Biochemistry Behavior* 75: 537-545.
- Márquez, A.C., Lara, O.F., Esquivel, R.B., Mata, E.R. 1999. Plantas medicinales de México II. Universidad Nacional Autónoma de México. Volúmen 2. 19-20.
- Mignot, E., Taheri, S., Nishino, S. 2002. Sleeping with the hypothalamus: Emerging therapeutic targets for sleep disorders. *Nature neuroscience supplement* 5: 1071-1075.
- Molina, M., Contreras, C., Tellez-Alcantara, P., Rodríguez, F. 1999. Sedative actions of *Ternstroemia sylvatica*. *Phytomedicine* 6: 115-118.
- Molina-Hernández, M., Téllez-Alcántara, N.P., Pérez, J., Olivera, J.I., Jaramillo, M.T. 2004. Anxiolytic-like actions of leaves of *Casimiroa edulis* (Rutaceae) in male Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 93-98.
- Monroy-Ortiz, C., Castillo-España, P. 2007. Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. Universidad Autónoma del estado de Morelos. 220-225.
- Mora, S., Diaz-Veliz, G., Lungenstrass, H., García-González, M., Coto-Morales, T., Poletti, C., De lima, T. C. M., Herrera-Ruiz, M., Tortoriello, J., 2005. Central nervous system of hydroalcoholic extract of *Casimiroa edulis* in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 191-197.
- Murota, K., Shimizu, S., Miyamoto, S., Izumi, T., Obata, A., Kikuchi, M., terao, J. 2002. Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal caco-2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids. *JN The Journal of Nutrition* 132: 1956-1961.
- Navarrete, A., Avula, B., Choi, Y-W., Khan, I.A. 2006. Chemical Fingerprinting of Valeriana Species: Simultaneous Determination of Valerenic Acids, Flavonoids and Phenylpropanoids using HPLC with UV-detection. *Journal of AOAC International* 89: 8-15.

-
- Nielsen, I.L.F., Chee, W.S.S., Poulsen, L., Offord-Cavin, E., Rasmussen, S.E., Frederiksen, H., Enslin, M., Barron, D., Horcajada, M., Williamson, G. 2006. Nutrient physiology, metabolism, and nutrient-nutrient interactions. *The Journal of Nutrition* 136: 404-408.
- Oliva, I., González-Trujano, M.E., Arrieta, J., Enciso-Rodríguez, R., Navarrete, A. 2004. Neuropharmacological profile of hydroalcohol extract of *Valeriana edulis* ssp. *procera* roots in mice. *Phytotherapy Research* 18: 290-296.
- Orallo, F., Álvarez, E., Basaran, H., Lugnier, C. 2004. Comparative study of the vasorelaxant activity, superoxide-scavenging ability and cyclic nucleotide phosphodiesterase-inhibitory effects of hesperetin and hesperidin. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of pharmacology* 370: 452-463.
- Ogasahara S, Taguchi Y, Wada H. 1981. Changes in the levels of cyclic nucleotides in rat brain during the sleep-wakefulness cycle. *Brain Research* 213: 163-171.
- Pain, L., Oberling, P., Launoy, A., Di Scala, G. 1999. Effect nonsedative doses of propofol on an Innate Anxiogenic situation in Rats. *Anesthesiology*. 90: 191-196.
- Pauwels, P.J., Van Gompel, P.V., Leysen, J.E. 1993. Activity of serotonin (5-HT) receptor agonists, partial agonists and antagonists at cloned human 5-HT_{1A} receptors that are negatively coupled to adenylate cyclase in permanently transfected hela cells. *Biochemical Pharmacology* 45: 375-383.
- Ringdahl, E.N., Pereida, S.L., Delzell, J.E. 2004. Treatment of primary insomnia. *The Journal of the American Board of Family Medicine* 17: 212-219.
- Rolland, A., Fleurentin, J., Lanhers, M.C., Younos, C., Misslin, R., Mortier, F., Pelt, J.M. 1991. Behavioral effects of the American traditional plant *Eschscholzia californica*: sedative and anxiolytic properties. *Planta Medica* 57: 212-206.
- Sateia, M.J., Nowell, P.D. 2004. Insomina. *The Lancet*. 364: 1959-1973.
- Satoh S, Matsumura H, Hayaishi O. 1998. Involvement of adenosine A_{2A} receptor in sleep promotion. *European Journal of Pharmacology* 351: 155-162.
- Sarrajs, F., De Castro Manglano, P. 2007. The insomnia. *Anales del sistema sanitario de Navarra* 30, suplemento 1: 121-134.
- Serra, H., Mendes, T., Bronze, M.R., Simplicio, A.L. 2008. prediction of intestinal absorption and metabolism of pharmacologically active flavones and flavanones. *Bioorganic and Medicinal chemistry* 16: 4009-4018.

-
- Shigemoto, Y., Shinomiya, K., Mio, M., Azuma, N., Kamei, C. 2004. Effects of second-generation histamine H₁ receptor antagonists on the sleep-wakefulness cycle in rats. *European Journal of Pharmacology* 494:161-165.
- Silvestre, J.S, Fernández, A.G., Palacios, J.M. 1999. Preliminary evidence for an involvement of the cholinergic system in the sedative effects of rolipram in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 64: 1-5.
- Steiger A. 2006. Neurochemical regulation of sleep. *Journal of Psychiatric Research* 41: 537-552.
- Swatsitang, P., Tucker, G., Robards, K., Jardiene, D. 2000. Isolation and identification of phenolic compounds in *Citrus sinensis*. *Analytica Chimica Acta* 417: 231-240.
- 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.
- Tortora, G.J., Reynolds, S. 2003. Sensory, motor and integrative systems. En: Principles of anatomy and physiology. John Wiley & Sons, Inc. USA. 516-517.
- Tortoriello, J., Lozoya, X., 1992. Effect of *Galphimia glauca* methanolic extract on neuropharmacological tests. *Planta Medica* 58: 234-236.
- Tortoriello, J., Romero, O. 1992. Plants used by Mexican Traditional Medicine with presumable sedative properties: An ethobotanical approach. *Archives of Medical Research* 23: 111-116.
- Tortoriello, J., Ortega, A. 1993. Sedative effect of Galphimine B, a nor-seco-triterpenoid from *Galphimia glauca*. *Planta medica* 59: 398-400.
- Ugalde, M., Reza, V., Gonzáles-Trujano, M.E., Avula, B., Khan, I.A., Navarrete, A. 2005. Isovolografic analisis of sedative interaction between six central nervous system depressant drugs and *Valeriana edulis* hydroalcoholic extrac in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57: 1-9.
- Venkataramanan, R., Komoroski, B., Rtrom, S. 2006. In vitro and in vivo assessment of herb drug interactions. *Life Sciences* 78: 2105.2115.

-
- Viana, G.S., Vale, T.G., Pinho, R.S., Matos, F.J. 2000. Antinociceptive effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. *Journal of ethnopharmacology* 70: 323-327.
- Wang, Q., Rager, J.D., Weinstein, K., Kardos, P.S., Dobson, G.L. Li, Jibin, L., Hidalgo, I.J., Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *International Journal of pharmaceutics* 288: 349-359.
- Wasowski, C., Marder, M., Viola, H., Medina, J., Paladini, A. 2002. Isolation and identification of 6-methylapigenina, a competitive ligand for the brain GABA_A receptors, from *Valeriana wallichii*. *Planta medica* 68: 932-934.
- Wheatley, D. 2005. Medicinal plants for insomnia: A review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *Journal of Psychopharmacology* 19: 414-421.
- Zhang, H.T., O'Donnell J.M. 2000. Effects of rolipram on scopolamine-induced impairment of working and reference memory in the radial-arm maze tests in rats. *Psychopharmacology* 150: 311-316.

XII. ANEXO

La presente investigación genero la siguiente publicación:

Guzmán-Gutiérrez, S.L., Navarrete, A. 2009. Pharmacological exploration of the sedative mechanism of hesperidin identified as the active principle of *Citrus sinensis* flowers. *Planta medica* 75: 295-301.

Pharmacological Exploration of the Sedative Mechanism of Hesperidin Identified as the Active Principle of *Citrus Sinensis* Flowers

Authors

Silvia Laura Guzmán-Gutiérrez*, Andrés Navarrete

Affiliation

Facultad de Química, Departamento de Farmacia. Universidad Nacional Autónoma de México, México, México

Key words

- *Citrus sinensis*
- Rutaceae
- hesperidin
- sedative plants
- Mexican traditional medicine
- adenosine
- insomnia

Abstract

▼
The infusion of flowers of several species of *Citrus* genera is used as a sedative to treat insomnia in Mexican traditional medicine. The aims of this study were to investigate the sedative effect of different extracts of flowers of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Rutaceae) and describe the pharmacological action mechanism of the sedative active compounds of this plant. The methanol and dichloromethane extracts, obtained from the flowers of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Rutaceae), showed a dose-dependent sedative effect in the exploratory cylinder model in mice, with ED₅₀ (*i.p.*) values of 47.04 ± 12.03 mg/kg and 129.15 ± 21.25 mg/kg, respectively. Hesperidin (ED₅₀ = 11.34 ± 2.48 mg/kg) was identified in the methanol extract as the sedative active principle of this plant. The pre-

treatment with atropine (1 mg/kg *i.p.*), flumazenil (2 mg/kg *i.p.*), clonidine (0.01 mg/kg *i.p.*), isoproterenol (0.3 mg/kg *i.p.*), haloperidol (0.3 mg/kg *i.p.*), WAY 100635 (3 mg/kg *i.p.*), *p*-chlorophenylalanine (250 mg/kg *i.p.*, twice per day for 2 days), forskolin (3 mg/kg *i.p.*) and rolipram (0.173 mg/kg *i.p.*) did not modify the sedative effect of 30 mg/kg hesperidin. However, the sedative effect of this compound was potentiated by yohimbine (1.25 mg/kg *i.p.*) and buspirone (1 mg/kg *i.p.*), and reverted by pretreatment with aminophylline (30 mg/kg *i.p.*), caffeine (30 mg/kg *i.p.*) and several doses of 1,3-dimethyl-8-phenylxanthine (10, 30 and 54.7 mg/kg *i.p.*). These results suggest that adenosine receptors might be involved in the sedative action of hesperidin, identified as the active principle of the flowers of *Citrus sinensis*.

Introduction

▼
Insomnia is a subjective report of insufficient or non-restorative sleep despite adequate opportunity to sleep. It is a frequent problem around the world that affects people of all ages, with a major incidence in the elderly [1]. Insomnia is a prevalent form of sleep difficulty that impairs diurnal functioning, reduces the quality of life and enhances health care utilization/costs for millions worldwide. It is estimated that 10 to 15 percent of the adult population suffers from chronic insomnia; an additional 25 to 35 percent have presented transient or occasional insomnia [2]. Chronic insomnia is the most difficult kind of insomnia to treat [3]. Insomnia is treated pharmacologically and non-pharmacologically or with a combination of both [4]. Benzodiazepines, zolpidem, zopiclone and zaleplon, have been used for

the treatment of insomnia [4, 5]. Relaxation, stimulus control, sleep restriction and sleep hygiene are common behavioral therapies for insomnia [1].

The medicinal plants which endow anxiolytic or sedative properties constitute another option in insomnia treatment. Some medicinal plants are widely used as sleep inducers, including kava-kava (banned), passion flower, hops and valerian. There are several studies on the central nervous system (CNS) activity of these species and their active components [6]; for example, the flavanone glycoside hesperidin was identified as one of the sedative active components of *Valeriana walliichii* and *Valeriana officinalis* [7].

Hesperidin is an abundant and inexpensive subproduct of the citrus industry. This flavonoid possesses a wide range of pharmacological properties like hypolipidemic, antihypertensive, antioxidative, anticarcinogenic, anti-inflammatory and analgesic. Supplemental hesperidin helps in reducing edema or excessive swelling in the legs due

received Sept 1, 2008
revised Nov 10, 2008
accepted Dec 1, 2008

Bibliography

DOI 10.1055/s-0029-1185306
Planta Med 2009; 75: 1–7
© Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York ·
ISSN 0032-0943

Correspondence

Dr. Andrés Navarrete
Facultad de Química,
Departamento de Farmacia,
Universidad Nacional Autónoma
de México
Ciudad Universitaria
Coyoacán 04510
México D. F.
México
Phone: + 55 5622 5291
Fax: + 55 5622 5329
anavarrt@servidor.unam.mx

* Taken in part from the Ph.D. research work of S.L. Guzmán-Gutiérrez.

to fluid accumulation. The commercial product Daflon, containing a combination of hesperidin and diosmin, has shown beneficial effects in human subjects with chronic venous insufficiency. No signs of toxicity have been observed with the intake of hesperidin [8]. Marder and coworkers started to search the sedative mechanism of hesperidin, they performed binding studies in te cerebral cortex with benzodiazepine (BDZ), serotonin (5-HT_{1A}, 5-HT₂), glutamate (AMPA) and adenosine (A₁) receptors and they concluded that hesperidin is not a ligand of any of these receptors assayed [7]. Loscalzo and coworkers recently described the involvement of opioid receptors in the behavioral and antinociceptive effects of hesperidin [9].

Tortoriello and Romero, in their ethnobotanical study, showed that 81 medicinal plants are used in Mexico to treat disorders of the CNS; sixteen of them are specifically used in the treatment of insomnia. The flowers ("azahar") and leaves ("hojas de naranjo") of *Citrus* sp occupied the second and third place, respectively, in importance as sedative medicinal plants to treat insomnia, only after *Tilia* sp [10]. Enhancement of sleeping time induced by sodium pentobarbital, anxiolytic activity (elevated plus maze) and anticonvulsant activity for essential oil from peel and hydroalcoholic extract of leaves from *Citrus aurantium* has been reported in rodents [11, 12]. However, there are no pharmacological studies that provide scientific support for the traditional use of flowers of *Citrus* species as sleep inducer. Therefore, the aim of this study was to demonstrate the sedative effect of flowers of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Rutaceae); for this, we investigated the effect of intraperitoneal administration of organic extracts of *C. sinensis* in mice, using the exploratory cylinder test as model to evaluate the sedative effect [13, 14]. Then we performed bio-guided fractionation of the methanol extract of flowers of *C. sinensis* and investigated the pharmacological action mechanism of hesperidin, identified as the sole sedative active component in the flowers of *C. sinensis*.

Materials and Methods

Plant material

Citrus sinensis flowers were obtained from orange producers from San Luis Potosi, México. A sample was deposited at the herbarium of Centro Medico Nacional Siglo XXI, voucher number IMSSM15436.

General

Melting points were determined on an Electrothermal Digital IA9100 melting point apparatus and are uncorrected. IR spectra were taken on a Perkin Elmer model 599-B spectrophotometer. ¹H- and ¹³C-NMR spectra were obtained on Varian Unity Inova (300 or 75 MHz) instruments, with DMSO-*d*₆ as solvent and TMS as internal standard. EI mass spectra (ionization energy of 70 eV) were obtained on a Hewlett-Packard model 5890 spectrometer.

Extraction and isolation

The flowers were dried under in the shade at room temperature (22 ± 5 °C) and ground in a manual miller. The plant material (4 kg) was successively extracted with hexane (3 × 5 L), dichloromethane (3 × 5 L) and methanol (3 × 5 L) by maceration at room temperature during periods of 48 h. The extracts were filtered by gravity and the solvents were evaporated under vacuum, obtaining hexane (50 g), dichloromethane (37 g) and methanol (383 g) extracts. The crude extracts were tested for sedative ac-

tivity at different doses (3 to 300 mg/kg) in the exploratory cylinder model. The methanol extract showed the major sedative activity. A fraction of this extract (20 g) was redissolved in water (100 mL) and partitioned with dichloromethane (100 mL). Three parts were formed; organic, aqueous and an interface. From the interface precipitated a solid (553 mg) that was purified by recrystallization with a mixture of methanol and dimethyl sulfoxide (9:1), affording a white solid (348 mg) m.p. 260–262 °C, identified as hesperidin by comparison of NMR data with those reported in the literature [7, 15], in addition to mass spectrometry and infrared spectra and also by comparison by liquid chromatography with an authentic sample of hesperidin (Sigma; purity 94.69%). Copies of the original spectra are obtainable from the author of correspondence.

Drugs

Hesperidin (94.26%), isolated from *C. sinensis* flowers, and commercial hesperidin, purchased from Sigma Co. (purity 94.69%) were used as references for comparison. Atropine sulfate, a muscarinic antagonist (1 mg/kg); flumazenil, a benzodiazepine antagonist (2 mg/kg); isoproterenol, a β agonist (0.3 mg/kg); caffeine, a non-selective phosphodiesterase inhibitor and adenosine antagonist (30 mg/kg); clonidine hydrochloride, an α₂ agonist (0.01 mg/kg); yohimbine, an α₂ antagonist (1.25 mg/kg); haloperidol, a D₂ antagonist (0.3 mg/kg); WAY 100635, a specific 5-HT_{1A} antagonist (3 mg/kg); buspirone, a specific 5-HT_{1A} agonist (1 mg/kg); rolipram, a selective phosphodiesterase type 4 inhibitor (0.173 mg/kg); forskolin, an adenylyl cyclase activator (3 mg/kg); 1,3-dimethyl-8-phenylxanthine, an adenosine antagonist (10, 30, 54.7 mg/kg); DL-4-chlorophenylalanine (*p*-chlorophenylalanine, PCPA), a serotonin synthesis inhibitor (250 mg/kg × 4); 5'-(*N*-ethylcarboxamido)-adenosine (NECA), an adenosine agonist (0.00547 mg/kg) and Tween 80 were purchased from Sigma Co. Aminophylline, a non-selective phosphodiesterase inhibitor and adenosine antagonist (30 mg/kg) was acquired from ICN Pharmaceuticals Inc. The purity of the drugs was over 97%.

Animals

Adult male ICR mice (25–35 g) were obtained from Centro UNAM-Harlan (Harlan, México). Each experimental group consisted of six animals. They were maintained at constant room temperature (22 ± 1 °C) and submitted to a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) adopted in our laboratory, and in compliance with international rules on care and use of laboratory animals.

Procedure

All behavioral evaluations were carried out from 9:00 to 15:00 h. Hesperidin was suspended by the sequential addition of 10% DMSO, 10% ethanol, and 80% saline solution (0.9%). Atropine sulfate, clonidine, isoproterenol, buspirone, caffeine, aminophylline, 1,3-dimethyl-8-phenylxanthine and PCPA were dissolved in saline solution (0.9%). The extracts and the other drugs were suspended in 0.5% Tween 80 in saline solution (0.9%). The solutions and the suspensions were intraperitoneally injected in a volume of 0.1 mL/10 g body weight. Control animals received the same volume of vehicle (0.5% Tween 80 in saline solution; 10% DMSO, 10% ethanol and 80% saline solution or saline solution). The volume of DMSO or ethanol received by each animal

was 0.01 mL/10 g body weight and this amount did not modify the response evaluated.

The apparatus consisted of a glass cylinder (30 cm in height, 11 cm in diameter, with a wall of 3 mm). The cylinder was placed on paper in a room with constant lighting and isolated from external noise [13, 14, 16].

An individual naïve mouse was put on the filter paper-covered floor of the glass cylinder; the number of rears performed over a 5-min period was recorded. The inner side of the apparatus and floor were cleaned with alcoholic solution (10% v/v) and filter paper was changed between each animal test session [13]. During observation, the experimenter stood next to the apparatus always at the same place. The observations were made without prior knowledge of the experimental conditions applied to the animal. Reduced exploratory rearing showed by naïve mice after placement in an unfamiliar environment reveals a sedative effect [13, 16].

Dose-response curves were constructed to assess the sedative effect of *C. sinensis* extracts (10–547.7 mg/kg) and hesperidin (3–300 mg/kg) that were administered 30 min before testing and by using six animals at each of at least five doses that were used to determine a dose-response curve. The dose that produced 50% of sedation (ED_{50} , 50% of reduction in the rears number of the control group) and its associated standard error of the mean (SEM) were calculated using standard lineal regression analysis of the log dose-response [17].

Exploration of the sedative action mechanism of hesperidin

To investigate the sedative action mechanism of hesperidin, the experimental design was as follows: a first group (control vehicles group) received the hesperidin vehicle and the vehicle of the drug; a second group received the drug and hesperidin vehicle (drug control group); a third group received drug vehicle and hesperidin at 30 mg/kg (hesperidin control group) and a fourth group received the combination of hesperidin and the drug. Hesperidin was administered 30 minutes before testing. The drug or its vehicle was administered 45 minutes before testing, with exception of buspirone and clonidine, that were administered 10 minutes before testing and PCPA that was administered twice per day at 12 h intervals on two consecutive days prior to the experiment. Experimental doses were selected according to the literature and preliminary experiments to define those doses that did not alter the number of rearings in the exploratory cylinder.

Statistical analysis

The results are presented as mean \pm SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Fisher LSD test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Intraperitoneal administration of dichloromethane and methanol extracts of *C. sinensis* flowers induced a dose-dependent decrease of the rearing activity in mice compared with controls (Fig. 1), with the methanol extract being more active ($ED_{50} = 47.04 \pm 12.03$ mg/kg) than the dichloromethane extract ($ED_{50} = 129.15 \pm 21.25$ mg/kg). The hexane extract did not show an effect (Fig. 1). The partition of the methanol extract with water and dichloromethane led to three fractions: an aqueous

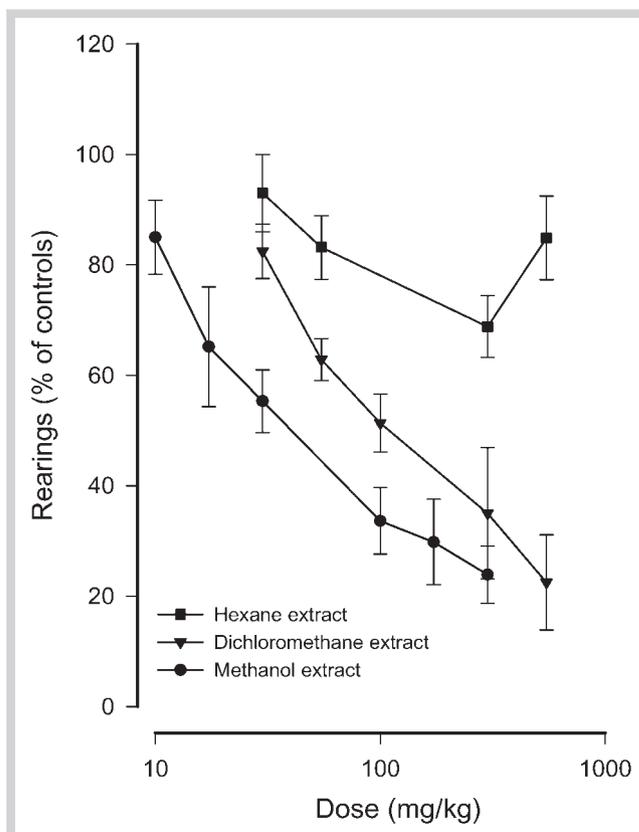


Fig. 1 Dose-response curves plotting % of rearing with respect to the control represented on the y-axis for the sedative effect of the hexane, dichloromethane and methanol extracts of *Citrus sinensis* flowers. Values are expressed as mean \pm S. E. M. of 6 experiments. Doses (mg/kg) are represented in a logarithmic scale on the x-axis.

fraction, an organic fraction and an interface fraction. These three fractions were tested for sedative activity (Fig. 2); the solid obtained from the interface showed a potent sedative effect with an $ED_{50} = 24.88 \pm 10.4$ mg/kg, whereas the aqueous and organic fractions showed a low sedative effect (Fig. 2; $ED_{50} > 1000$ mg/kg). After purification, the solid was identified as hesperidin, that exhibited an $ED_{50} = 11.34 \pm 2.48$ mg/kg (Fig. 2).

To investigate the sedative action mechanism of hesperidin, we used a submaximal dose of 30 mg/kg that produced 75% of sedative effect (Fig. 2).

Pretreatment with atropine (1 mg/kg *i.p.*), flumazenil (2 mg/kg *i.p.*), clonidine (0.01 mg/kg *i.p.*), isoproterenol (0.3 mg/kg *i.p.*), haloperidol (0.3 mg/kg *i.p.*), WAY 100635 (3 mg/kg *i.p.*), *p*-chlorophenylalanine (250 mg/kg *i.p.*, twice per day for 2 consecutive days), forskolin (3 mg/kg *i.p.*) and rolipram (0.173 mg/kg *i.p.*) did not modify the sedative effect of 30 mg/kg hesperidin (Table 1). Pretreatment with yohimbine (1.25 mg/kg *i.p.*) and buspirone (1 mg/kg *i.p.*) increased the sedative effect of hesperidin (Fig. 3) whereas pretreatment with aminophylline (30 mg/kg *i.p.*), caffeine (30 mg/kg *i.p.*) (Fig. 4), and several doses of 1,3-dimethyl-8-phenylxanthine (10, 30 and 54.7 mg/kg *i.p.*) reversed the sedative effect of hesperidin (Fig. 5).

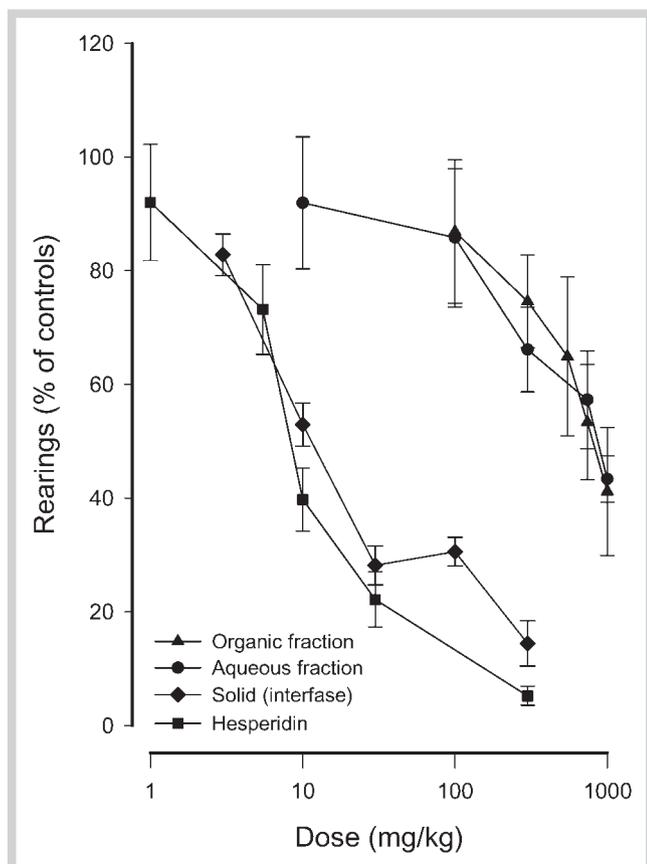


Fig. 2 Dose-response curves for the organic, aqueous and solid fractions obtained from the methanol extract of *Citrus sinensis* flowers and for purified hesperidin. Values are expressed as mean \pm S. E. M. of six mice.

Discussion

The present study revealed clearly that the methanol and dichloromethane extracts obtained from *Citrus sinensis* flowers exerted a sedative effect in the exploratory cylinder model when they were intraperitoneally administered (Fig. 1). It is clear that these results may be different if the compounds are administered by oral route, because the bioavailability is different, furthermore the intraperitoneal route is not used in the traditional

medicine; however we used the intraperitoneal route to observe acute effects.

In the present study the ED₅₀ value for the methanol extract was 2.75 times the ED₅₀ value for the dichloromethane extract. This fact encouraged us to search for the sedative active compounds of the methanol extract of flowers of *C. sinensis*. In preliminary experiments, the methanol extract was fractionated by percolation on silica gel into hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol fractions, however the results for sedative activity of these fractions were inconsistent and all of them were less active than the original methanol extract (data not shown). Hence we decided to perform the partition of the methanol extract between water and dichloromethane that led to a solid from the interface. This solid (ED₅₀ = 24.88 \pm 10.40 mg/kg) was 1.9 times more active than the methanol extract (ED₅₀ = 47.04 \pm 12.03 mg/kg). After purification by recrystallization, this solid was identified as the flavanone glycoside hesperidin. This compound (ED₅₀ = 11.34 \pm 2.48 mg/kg) was 4 times more active as a sedative than the methanol extract. The sedative activity for hesperidin has been already reported by Marder and coworkers [7]. These authors also have explored the sedative mechanism for this compound, concluding that hesperidin is not a ligand for benzodiazepine (BDZ), serotonin (5-HT_{1A}, 5-HT₂), glutamate (AMPA) and adenosine (A₁) receptors [7]. Another study reported the involvement of opioid receptors in the sedative and antinociceptive effects of hesperidin [9]. No more reports have been published on the description of the pharmacological mechanism on CNS activity for this compound. Therefore we decided to investigate the involvement of different neurotransmitter systems in the mechanism of action of hesperidin that regulate sedation.

It has been reported that medetomidine, an α_2 -agonist, induces sedation and hypothermia in mice [18]. The sedative action of hesperidin by activation of α_2 -adrenergic receptors was discarded, because yohimbine, an α_2 -adrenergic receptor antagonist, did not antagonize its sedative activity. Instead, yohimbine significantly increased the sedative effect of hesperidin (Fig. 3), whereas clonidine, an α_2 -adrenergic receptor agonist, did not modify the sedative effect of hesperidin (Table 1). Similar results have been reported for yohimbine in the chick separation stress paradigm model [19]. It has also been reported that yohimbine elevates central dopamine and decreases central serotonin turnover rates in rats [18]. The observation that yohimbine has affinity for 5-HT_{1A} receptors [20] could be another explanation for the synergistic effect of yohimbine on the sedative effect of hesperidin. Therefore to explain this synergistic sedative effect,

Table 1 Rearings in the exploratory cylinder model in mice after administration of hesperidin or hesperidin in the presence of different drugs.

Drug	Dose (mg/kg)	Control	Drug alone	Hesperidin alone (3 mg/kg)	Hesperidin (30 mg/kg) plus drug
Atropine	1	46.25 \pm 3.45	48.00 \pm 7.69	18.27 \pm 2.50 ^a	25.50 \pm 7.24 ^a
Flumazenil	2	43.17 \pm 7.59	47.80 \pm 3.34	14.40 \pm 4.58 ^a	19.00 \pm 4.25 ^a
Clonidine	0.01	30.50 \pm 6.14	24.83 \pm 6.47	7.83 \pm 1.96 ^a	8.50 \pm 2.30 ^a
Isoproterenol	0.3	37.67 \pm 5.82	30.83 \pm 2.76	10.67 \pm 1.80 ^a	19.33 \pm 2.74 ^a
Haloperidol	0.3	42.40 \pm 1.33	30.25 \pm 6.26 ^a	13.40 \pm 2.62 ^a	10.20 \pm 2.50 ^a
WAY 100635	3	47.33 \pm 3.39	43.00 \pm 2.51	22.00 \pm 2.76 ^a	25.60 \pm 5.15 ^a
p-Chlorophenylalanine	250	42.17 \pm 5.74	37.50 \pm 5.43	13.60 \pm 4.31 ^a	12.83 \pm 2.18 ^a
Forskolin	3	46.60 \pm 2.67	45.60 \pm 5.68	22.25 \pm 3.04 ^a	15.49 \pm 6.32 ^a
Rolipram	0.173	56.67 \pm 5.81	62.17 \pm 5.47	18.33 \pm 2.02 ^a	27.67 \pm 4.11 ^a

Each value is the mean of at least of six experiments \pm S. E. M. (except of WAY 100635 experiment). ^a Significantly different respect with the control groups ($p \leq 0.5$).

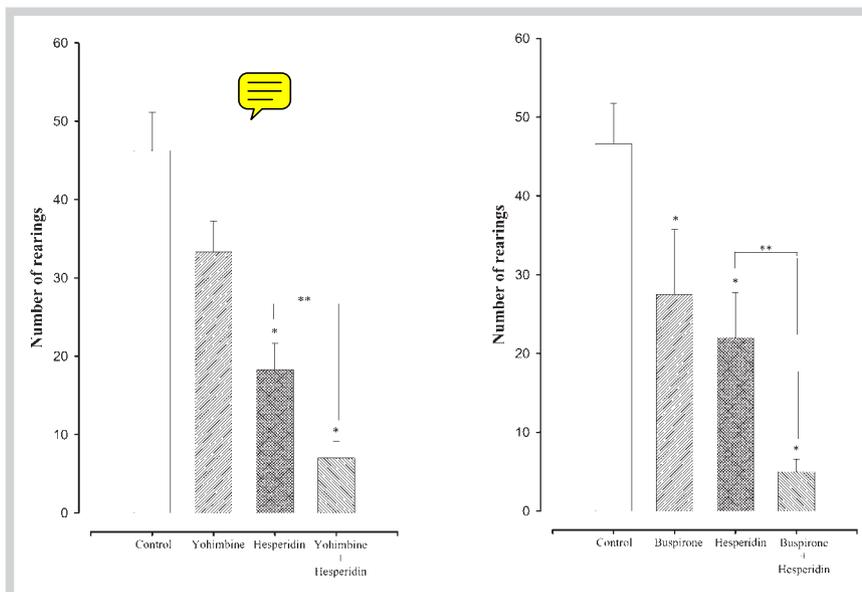


Fig. 3 Sedative effect of hesperidin (30 mg/kg, *i. p.*) in mice pretreated with yohimbine (1.25 mg/kg *i. p.*; panel **A**) or buspirone (1 mg/kg *i. p.*; panel **B**) measured by the number of rearings in the exploratory cylinder test. The number of rearings is expressed as mean ± S. E.M of 6 experiments on the y-axis. Each drug and combinations are indicated on the x-axis. The symbols denote significance difference ($p < 0.05$) * from the control group, ** from the hesperidin group. The data were analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher LSD test.

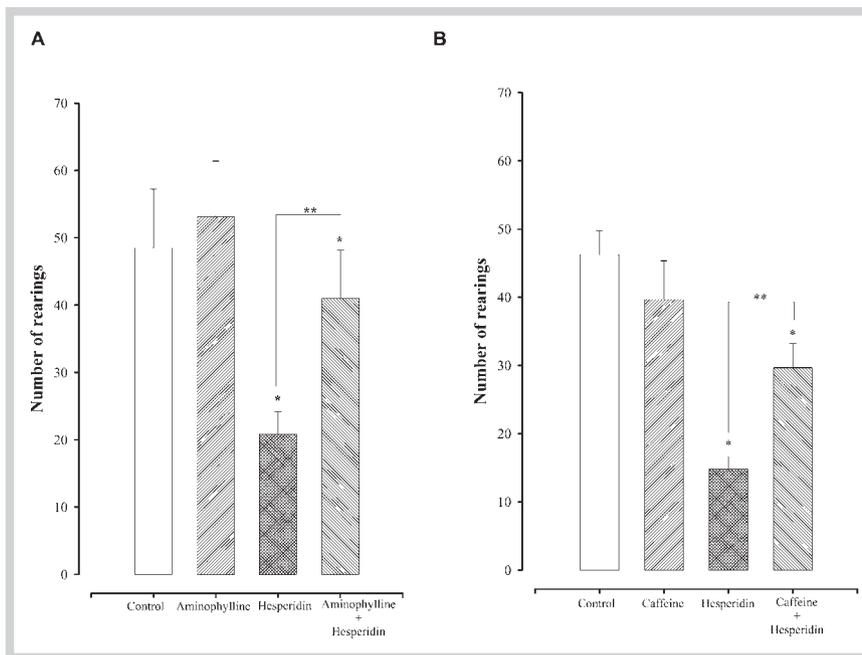


Fig. 4 Sedative effect of hesperidin (30 mg/kg, *i. p.*) in mice pretreated with aminophylline (30 mg/kg *i. p.*; panel **A**) or caffeine (30 mg/kg *i. p.*; panel **B**) measured with the number of rearings in the exploratory cylinder test. The number of rearings is expressed as mean ± S. E.M of 6 experiments on y-axis. Each drug and combinations are indicated on the x-axis. The symbols denote significance difference ($p < 0.05$) * from the control group, ** from the hesperidin group. The data were analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher LSD test.

we decided to assess the sedative effect of hesperidin in the presence of haloperidol (D₂-antagonist) and buspirone (5-HT_{1A} agonist). Buspirone increased the sedative effect of hesperidin (● Fig. 3), whereas haloperidol did not modify the effect of hesperidin (● Table 1). These results could suggest the involvement of 5-HT_{1A} receptors. Therefore, to contrast this hypothesis, we assessed the effect of WAY 100635, a selective 5-HT_{1A} antagonist on the sedative action of hesperidin, with the expectation of reversing activity. However WAY 100635 did not modify the sedative effect of hesperidin (● Table 1). In addition serotonin depletion by *p*-chlorophenylalanine (PCPA) failed to alter the activity of hesperidin (● Table 1). Therefore it seems that hesperidin does not act through a serotonergic way. In spite of this, a number of pharmacological studies utilizing agonists and antagonists of different types of serotonin receptors and 5-HT_{1A} receptor knockout mice suggest that serotonin may be involved in maintaining

wakefulness [21]. As described above, the sedative effect of hesperidin was increased by yohimbine and buspirone. These two drugs have as a common feature that both decrease the levels of cAMP [22,23]. The possibility that also hesperidin decreases the levels of cAMP was assessed by using forskolin, an activator of adenylyl cyclase and aminophylline, a non-selective inhibitor of phosphodiesterases (PDE) with weak antagonist activity on adenosine receptors, expecting that these drugs antagonize the sedative effect of hesperidin [24–26]. However, only aminophylline was able to antagonize the effect of hesperidin (● Fig. 4), but rolipram, a selective inhibitor of phosphodiesterase type 4 (PDE4) with action on the CNS [26] did not modify the effect of hesperidin (● Table 1). In addition, caffeine, an antagonist of adenosine receptors without an effect on decrease of activity of cerebral phosphodiesterases [27], also inhibited the sedative effect of hesperidin (● Fig. 4). These results suggest that hesperidin could

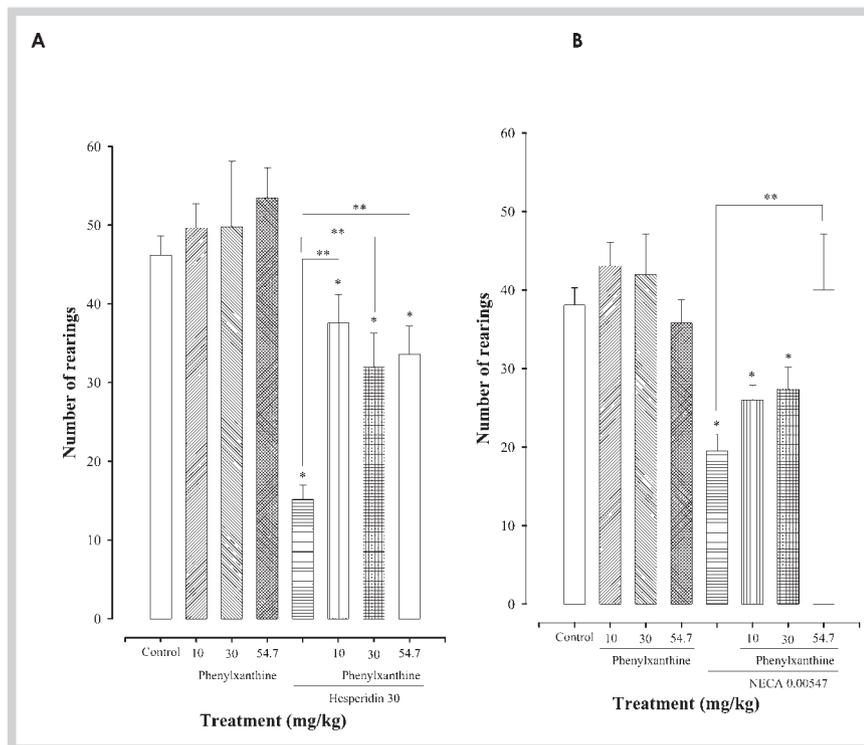


Fig. 5 Effect of the pretreatment with 1,3-dimethyl-8-phenylxanthine on the sedative effect of hesperidin (A) or on the sedative effect of 5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine (NECA) (B), measured in the exploratory cylinder test in mice. The number of rearings is expressed as mean \pm S.E.M. of 6 experiments on y-axis. Each drug and combinations are indicated on the x-axis. The symbols denote the significance of the difference ($p < 0.05$) * from the control group, ** from the hesperidin group. The data were analyzed by one-way ANOVA followed by Fisher LSD test.

act through adenosine receptors. To test this proposition, we assessed the sedative effect of hesperidin in the presence of 1,3-dimethyl-8-phenylxanthine, a more selective adenosine antagonist than aminophylline and caffeine [28]. 1,3-Dimethyl-8-phenylxanthine reversed the sedative effect of hesperidin at lower doses than those necessary to inhibit the sedative effect of 5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine (NECA) (Fig. 5), an adenosine agonist [29]. We used three doses of 1,3-dimethyl-8-phenylxanthine because we wanted to evaluate the effect of this more selective adenosine antagonist in a wider range of doses on the effect of hesperidin in the exploratory cylinder model. Therefore the results suggest that hesperidin acts through adenosine receptors as an agonist of the somnogenic A_1 or A_{2A} adenosine receptors, however our results contrast with those reported by Marder and co-workers (2003) who reported that hesperidin did not bind to A_1 adenosine receptors in membranes of rat brain cortex [7]. However, the results obtained in the cortex do not necessarily have to be the same as those obtained in basal forebrain or in the subarachnoid space below the rostral basal forebrain, places where adenosine binds to A_1 and A_2 receptors, respectively, to exert its action as sleep inductor [21]. The traditional use of *Citrus sinensis* flowers as sedative can be related to the content of hesperidin, identified here as the sedative active principle of this plant. The action of hesperidin on adenosine receptors is in agreement with the opposite effect observed with the consumption of beverages like coffee and tea which contain antagonistic compounds of adenosine such as caffeine and theobromine. These beverages are used to maintain wakefulness. In addition, it has been reported that some flavonoids are ligands for A_1 adenosine receptor [30] and that the administration of the flavonoid quercetin in man leads to an increase in plasma adenosine levels [31].

The cholinergic, benzodiazepine/GABA complex and β -adrenergic receptors did not participate in the sedative action of hesperidin, as was suggested by the pretreatment with atropine, fluma-

zenil and isoproterenol, which did not modify the sedative effect of hesperidin (Table 1).

The role of medicinal plants and natural products with scientific support has an important value in the treatment of insomnia, the most prevalent sleep disorder. The results obtained here support the use of this popular remedy in the Mexican traditional medicine as a sleep aid that has the same active sedative compound as valerian, a very well-known species with proven sedative properties. Finally, this work is a contribution to the pharmacology of hesperidin. However, it is necessary to perform more experiments that include other pharmacological mechanisms involved in the sleep/awake process related with the effect of this flavonoid.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA IN 205 008) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 82 613). The authors are grateful to R.I. del Villar, M. Gutiérrez, and G. Duarte-Lisci for running the IR, NMR, and GC/MS spectra. S.L. Guzmán-Gutiérrez acknowledges fellowship for graduated studies from CONACYT Number 200933.

References

- 1 Nau SD, McCrae CS, Cook KG, Lichstein KL. Treatment of insomnia in older adults. *Clin Psychol Rev* 2005; 25: 645–672
- 2 Roth T. New developments for treating sleep disorders. *J Clin Psychiatry* 2001; 62 (Suppl. 10): 3–4
- 3 Kamel NS, Gammack JK. Insomnia in the elderly: cause, approach, and treatment. *Am J Med* 2006; 119: 463–469
- 4 Benca RM. Diagnosis and treatment of chronic insomnia: a review. *Psychiatr Serv* 2005; 56: 332–343
- 5 Gottesmann C. GABA mechanisms and sleep. *Neuroscience* 2002; 111: 231–239

- 6 *Wheatley D.* Medicinal plants for insomnia: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *J Psychopharmacol* 2005; 19: 414–421
- 7 *Marder M, Viola H, Wasowski C, Fernández S, Medina JH, Paladini AC.* 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 75: 537–545
- 8 *Garg A, Garg S, Zaneveld LJD, Sinlge AK.* Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother Res* 2001; 15: 655–669
- 9 *Loscalzo LM, Wasowski C, Paladini AC, Marder M.* Opioid receptors are involved in the sedative and antinociceptive effects of hesperidin as well as in its potentiation with benzodiazepines. *Eur J Pharmacol* 2008; 580: 306–313
- 10 *Tortoriello J, Romero O.* Plants used by Mexican traditional medicine with presumable sedative properties: an ethnobotanical approach. *Arch Med Res* 1992; 23: 111–116
- 11 *Carvalho-Freitas MIR, Costa M.* Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 1629–1633
- 12 *Pultrini Ade M, Galindo LA, Costa M.* Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sci* 2006; 78: 1720–1725
- 13 *Oliva I, González-Trujano ME, Arrieta J, Enciso-Rodríguez R, Navarrete A.* Neuropharmacological profile of hydroalcoholic extract of *Valeriana edulis* ssp. procera roots in mice. *Phytother Res* 2004; 18: 290–296
- 14 *Ugalde M, Reza V, González-Trujano ME, Avula B, Khan IA, Navarrete A.* Isobolographic analysis of the sedative interaction between six central nervous system depressant drugs and *Valeriana edulis* hydroalcoholic extract in mice. *J Pharm Pharmacol* 2005; 57: 631–639
- 15 *Li C, Gu H, Dou H, Zhou L.* Identification of flavanones from peel of *Citrus changshan-huyou* Y.B. Chang, by HPLC-MS and NMR. *Eur Food Res Technol* 2007; 225: 777–782
- 16 *Hiller K, Zetler G.* Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis* L.: behavioral and anticonvulsant properties. *Phytother Res* 1996; 10: 145–151
- 17 *Tallarida R.* Drug synergism and dose-effect data analysis. Boca Raton: Chapman and Hall/CRC Press; 2000: 21–35
- 18 *Haapalinna A, Viitamaa T, MacDonald E, Savola JM, Tuomisto L, Virtanen R et al.* Evaluation of the effects of a specific α 2-adrenoceptor antagonist, atipamezole, on α 1 and α 2-adrenoceptor subtype binding, brain neurochemistry and behaviour in comparison with yohimbine. *Nauyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1997; 356: 570–582
- 19 *Warnick JE, Wicks RT, Sufka KJ.* Modeling anxiety-like states: pharmacological characterization of chick separation stress paradigm. *Behav Pharmacol* 2006; 17: 581–587
- 20 *Winter JC, Rabin RA.* Yohimbine as a serotonergic agent: evidence from receptor binding and drug discrimination. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263: 682–689
- 21 *Datta S, MacLean RR.* Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep-wake behavior: reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. *Neurosci Biobehav Rev* 2007; 31: 775–824
- 22 *Kuno N, Kamisaki Y, Itoh T.* Inhibition of cyclic AMP accumulation by α 2-adrenoceptors in the rat cerebral cortex. *Eur J Pharmacol* 1990; 176: 281–287
- 23 *Pauwels PJ, Van Gompel P, Leysen JE.* Activity of serotonin (5-HT) receptor agonists, partial agonists and antagonists at cloned human 5-HT1A receptors that are negatively coupled to adenylate cyclase in permanently transfected HeLa cells. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 375–383
- 24 *Barnes PJ.* Pharmacology of airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: S123–132
- 25 *Ogasahara S, Taguchi Y, Wada H.* Changes in the levels of cyclic nucleotides in rat brain during the sleep-wakefulness cycle. *Brain Res* 1981; 213: 163–171
- 26 *Zhang HT, O'Donnell JM.* Effects of rolipram on scopolamine-induced impairment of working and reference memory in the radial-arm maze tests in rats. *Psychopharmacology* 2000; 150: 311–316
- 27 *Nehlig A, Daval JL, Debry G.* Caffeine and the central nervous system: mechanism of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev* 1992; 17: 139–170
- 28 *Fredholm BB, Persson CGA.* Xantine derivatives as adenosine receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1982; 81: 673–676
- 29 *Satoh S, Matsumura H, Hayaishi O.* Involvement of adenosine A2A receptor in sleep promotion. *Eur J Pharmacol* 1998; 351: 155–162
- 30 *Ingkaninan K, Ijzerman AP, Verpoorte R.* Leuteolin, a compound with adenosine A1 receptor-binding activity, and chromone and dihydronaphthalenone constituents from *Senna siamea*. *J Nat Prod* 2000; 63: 315–317
- 31 *Blardi P, De Lalla A, Volpi L, Di Perri T.* Stimulation of endogenous adenosine release by oral administration of quercetin and resveratrol in man. *Drugs Exp Clin Res* 1999; 25: 105–110

Dear Author: please list all authors in refs (no et al. allowed in new guidelines 2009) – thank you