



**Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza**

Determinación de la actividad ansiolítica y/o
sedante de los extractos orgánicos y acuoso
de *Lippia graveolens* Kunth.

Tesis

Que para obtener el título de Biólogo presenta:

Laura Yunuen Hernández Sánchez

Director de tesis: Dra. Maria Eva González Trujano

Asesor Interno: Dra. Eva Aguirre Hernández



Marzo 2015

México, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

No hay tarea humana que sea producto de un solo individuo.

A mis padres, por su apoyo

A Elizabeth, por llenar mi vida

A mis hermanos, por su cariño y apoyo.

Agradecimientos

De manera muy especial a mi Directora de Tesis, la Doctora María Eva González Trujano por todo el apoyo brindado durante el desarrollo del presente trabajo.

De manera muy sincera, quiero expresarle mi gratitud y admiración a la doctora Eva Aguirre, por la orientación y apoyo brindados durante el desarrollo de este trabajo pero especialmente por aventurarse conmigo en este proyecto que al final nos ha dejado un buen sabor de boca. Gracias por brindarme su confianza, paciencia, consejos, amistad y enseñarme que en la vida la dedicación, empeño y esfuerzo constante son la clave para conseguir el éxito.

A la Q.A. Verónica Muñoz Ocotero por ayudarme en la obtención de extractos brindándome su apoyo y asesoría.

Al Dr. Alejandro Dorazco González por todo el apoyo que me brindo para lograr la elucidación de los compuestos aislados.

Doy gracias a la unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo brindado para la realización de este proyecto así mismo agradezco la asesoría técnica proporcionada por el Dr. Enrique Pinzón Estrada y el Dr. Ismael Torres Saldaña.

A Lilia, David y Nancy por su gran amistad y apoyo incondicional, las metas acompañadas se disfrutaban mejor, LOVE YOU.

La luna

La luna se puede tomar a cucharadas
o como una cápsula cada dos horas.
Es buena como hipnótico y sedante
y también alivia a los que se han intoxicado de filosofía.
Un pedazo de luna en el bolsillo
es mejor amuleto que la pata de conejo:
sirve para encontrar a quien se ama,
para ser rico sin que lo sepa nadie
y para alejar a los médicos y las clínicas.
Se puede dar de postre a los niños
cuando no se han dormido,
y unas gotas de luna en los ojos de los ancianos
ayudan a bien morir.

Pon una hoja tierna de la luna
debajo de tu almohada
y mirarás lo que quieras ver.
Lleva siempre un frasquito del aire de la luna
para cuando te ahogues,
y dale la llave de la luna
a los presos y a los desencantados.
Para los condenados a muerte
y para los condenados a vida
no hay mejor estimulante que la luna
en dosis precisas y controladas.

Jaime Sabines.

Contenido	Pág.
Índice de abreviaturas.	7
Índice de cuadros.	8
Índice de figuras.	9
Resumen.	11
Introducción.	12
1. Marco teórico.	14
1.1 Ansiedad.	14
1.1.1 Tipos de ansiedad.	14
1.1.2 Terapéutica de la ansiedad.	15
1.2 Herbolaria.	17
1.2.1 Plantas con actividad ansiolítica.	17
1.2.2 Estudios preclínicos de plantas con propiedades ansiolíticas.	19
1.3 <i>Lippia graveolens</i> Kunth.	21
1.3.1 Distribución.	24
1.3.2 Etnobotánica.	24
1.3.3 Química.	25
1.3.4 Farmacología.	25
2. Justificación.	27
3. Objetivos.	28
3.1 General.	28
3.2 Particulares.	28
4. Hipótesis.	28
5. Materiales y método.	29
5.1 Material vegetal.	29
5.2 Obtención de extractos.	29
5.3 Animales.	31
5.4 Diseño experimental.	31
5.5 Análisis farmacológico.	32
5.5.1 Evaluación de la actividad ambulatoria.	32
5.5.2 Evaluación de la actividad como ansiolítico-sedante.	33
5.5.3 Potenciación de la hipnosis inducida por pentobarbital Sódico.	34
5.5.4 Determinación de la dosis letal (DL ₅₀).	35

5.6 Análisis estadístico.	35
5.7 Análisis fitoquímico.	35
5.7.1 Separación, purificación e identificación de los compuestos puros del extracto de acetato de etilo, metanólico y acuoso de <i>L. graveolens</i> .	35
5.7.2 Análisis por CLAR del extracto acuoso de <i>L. graveolens</i> .	36
6. Resultados.	38
6.1 Rendimiento de los extractos.	38
6.2 Evaluación farmacológica de los extractos crudos (hexano, acetato de etilo, metanol y acuoso) de <i>L. graveolens</i> .	39
6.2.1 Actividad ambulatoria.	39
6.2.2 Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante en la pruebas de tablero con orificios, cilindro y brazos abiertos.	41
6.2.3 Potenciación de la hipnosis inducida por pentobarbital sódico.	49
6.2.4 DL50.	52
6.3 Análisis fitoquímico.	53
6.3.1 Obtención y análisis de los compuestos puros obtenidos del extracto metanólico y de acetato de etilo de <i>L. graveolens</i> .	53
6.3.2 Análisis por CLAR del extracto acuoso de <i>L. graveolens</i> .	56
6.4 Evaluación farmacológica de los compuestos puros obtenidos del extracto de acetato de etilo de <i>L. graveolens</i> .	57
6.4.1 Actividad ambulatoria.	57
6.4.2 Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante de los compuestos puros obtenidos del extracto de acetato de etilo de <i>L. graveolens</i> .	58
6.4.3 Potenciación de la hipnosis inducida con pentobarbital sódico de los compuestos aislados del extracto de acetato de etilo de <i>L. graveolens</i> .	61
7. Discusión.	62
8. Conclusiones.	66
9. Bibliografía.	67
10. Anexos.	75

Índice de abreviaturas

AcOET	Acetato de etilo
ANADEVA	Análisis de Varianza
CC	Cromatografía en Columna
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
°C	Temperatura en grados Centígrados
DL ₅₀	Dosis letal 50
DZP	Diazepam
EM	Espectrometría de masas
Fig	Figura
GABA	Ácido Gamma Amino-Butírico (por sus siglas en inglés)
g	Gramo
IMSS	Instituto Mexicano de Seguro Social
i.p.	Intraperitoneal
Kg	Kilogramo
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitros
No.	Número
µL	Microlitros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PS	Pentobarbital sódico
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
seg	Segundos
SNC	Sistema Nervioso Central
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

Índice de Cuadros

Cuadro No.	Pág.
1. Clasificación de los trastornos por ansiedad.	15
2. Tipos más frecuentes de fármacos utilizados para los trastornos de ansiedad.	16
3. Plantas utilizadas en la Medicina Tradicional Mexicana para el tratamiento de la ansiedad.	18
4. Plantas medicinales que han mostrado efecto ansiolítico en modelos animales.	20
5. Principales especies conocidas en México como “Orégano”.	23
6. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo.	36
7. Fraccionamiento cromatográfico del extracto Metanólico.	37
8. Rendimiento de los extractos obtenidos de hojas de <i>Lippia graveolens</i> .	38
9. Compuestos puros caracterizados en el extracto de Acetato de etilo.	54

Índice de Figuras

Figura No.	Pag.
1. <i>Lippia graveolens</i> Kunth.	22
2. Distribución de <i>Lippia graveolens</i> en México.	24
3. Colección de herbario <i>Lippia graveolens</i> .	29
4. Diagrama metodológico de las extracciones.	30
5. Ratones macho CD1.	31
6. Administración vía i.p. de los extractos a evaluar de <i>Lippia graveolens</i> .	31
7. Modelo de campo abierto.	32
8. Modelo de tablero con orificios.	33
9. Modelo de cilindro.	33
10. Modelo de cruz elevada.	34
11. Evaluación de la actividad ambulatoria del extracto hexánico de <i>Lippia graveolens</i> .	39
12. Evaluación de la actividad ambulatoria del extracto de acetato de etilo de <i>Lippia graveolens</i> .	40
13. Evaluación de la actividad ambulatoria del extracto metanólico de <i>Lippia graveolens</i> .	40
14. Evaluación de la actividad ambulatoria del extracto cuosos de <i>Lippia graveolens</i> .	41
15. Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante en el modelo de tablero con orificios del extracto hexánico de <i>Lippia graveolens</i> .	42
16. Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante en el modelo de tablero con orificios del extracto de acetato de etilo de <i>Lippia graveolens</i> .	42
17. Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante en el modelo de tablero con orificios del extracto metanólico de <i>Lippia graveolens</i> .	43
18. Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante en el modelo de tablero con orificios del extracto acuoso de <i>Lippia graveolens</i> .	43
19. Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante en el modelo de cilindro del extracto hexánico de <i>Lippia graveolens</i> .	44
20. Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante en el modelo de cilindro del extracto de acetato de etilo de <i>Lippia graveolens</i> .	45
21. Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante en el modelo de cilindro del extracto metanólico de <i>Lippia graveolens</i> .	45
22. Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante en el modelo de cilindro del extracto acuoso de <i>Lippia graveolens</i> .	46
23. Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante en el modelo brazos abiertos del extracto hexánico de <i>Lippia graveolens</i> .	47
24. Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante en el modelo brazos	

abiertos del extracto de acetato de etilo de <i>Lippia graveolens</i> .	47
25. Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante en el modelo brazos abiertos del extracto metanólico de <i>Lippia graveolens</i> .	48
26. Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante en el modelo brazos abiertos del extracto acuoso de <i>Lippia graveolens</i> .	48
27. Potenciación a la hipnosis inducida por pentobarbital sódico en el extracto hexánico de <i>Lippia graveolens</i> .	49
28. Potenciación a la hipnosis inducida por pentobarbital sódico en el extracto de acetato de etilo de <i>Lippia graveolens</i> .	50
29. Potenciación a la hipnosis inducida por pentobarbital sódico en el extracto metanólico de <i>Lippia graveolens</i> .	51
30. Potenciación a la hipnosis inducida por pentobarbital sódico en el extracto acuoso de <i>Lippia graveolens</i> .	52
31. Análisis de flavonoides por CLAR del extracto acuoso de <i>Lippia graveolens</i> .	53
32. Esquema del fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico de <i>Lippia graveolens</i> .	55
33. Esquema de los compuestos obtenidos mediante cromatografía en columna del extracto de acetato de etilo de <i>Lippia graveolens</i> .	56
34. Evaluación de la actividad ambulatoria de los compuestos puros obtenidos del extracto de acetato de <i>Lippia graveolens</i> .	57
35. Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante de los compuestos puros obtenidos del extracto de acetato de etilo de <i>Lippia graveolens</i> en el modelo de tablero con orificios.	58
36. Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante de los compuestos puros obtenidos del extracto de acetato de etilo de <i>Lippia graveolens</i> en el modelo de cilindro.	59
37. Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante de los compuestos puros obtenidos del extracto de acetato de etilo de <i>Lippia graveolens</i> en el modelo de brazos abiertos.	60
38. Potenciación a la hipnosis inducida con pentobarbital sódico de los compuestos puros obtenidos del extracto de acetato de etilo de <i>Lippia graveolens</i> .	61

Resumen

El género *Lippia* (familia Verbenaceae) está integrado por cerca de 200 especies que se distribuyen en América desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y en algunas regiones de África. *Lippia graveolens* Kunth conocido como “orégano mexicano” es ampliamente utilizado en Norteamérica como condimento. En México, las hojas también son usadas como remedio herbal por sus propiedad analgésica, anti-inflamatoria, ansiolítica, sedante, antidiarreica, antiemética, digestiva y antidisentérica; mismas que no han sido corroboradas mediante evidencias científicas por lo que en el presente estudio se evaluó el efecto ansiolítico-sedante de *L. graveolens* en ratones utilizando diferentes modelos experimentales. Los extractos se prepararon por maceración a temperatura ambiente de las hojas secas y molidas. Las extracciones se realizaron de manera sucesiva con el solvente hexano, seguidas de acetato de etilo y, finalmente con metanol. El extracto acuoso se preparó mediante la ebullición de las hojas secas y molidas y su posterior liofilización. Los extractos orgánicos polares se fraccionaron en columnas de cromatografía convencional. El fraccionamiento del extracto de acetato de etilo permitió obtener en forma pura tres compuestos cuya estructura se elucidó mediante Difracción de rayos X, RMN-¹H, RMN ¹³C y Espectrometría de Masas. Mismos que se caracterizaron como naringenina, cirsimaritina y mezcla de p-cimeno + timol. El análisis del extracto acuoso mediante cromatografía Líquida de Alta Resolución permitió la identificación de la apigenina 7-O-glucósido, galangina, quercetina y rutina. La actividad ansiolítica de los extractos, fracciones y/o compuestos se evaluó mediante las pruebas farmacológicas de campo abierto, tablero con orificios, cilindro, brazos abiertos y potenciación de la hipnosis inducida con pentobarbital sódico. Todos los extractos, en cada una de las dosis administradas (1-100 mg/kg, i.p.), así como los compuestos aislados (3 mg/kg, i.p.) presentaron respuestas significativas como ansiolíticos, siendo el extracto acuoso el único que induce sedación a la dosis de 100 mg/kg, i.p. Estos resultados dan evidencia experimental del potencial de las hojas *L. graveolens* como ansiolítico cuyas moléculas bioactivas son de diferente naturaleza química.

Palabras clave: *Lippia graveolens*, ansiolítico, sedante.

Introducción

En la época actual son comunes las afecciones y trastornos del sistema nervioso central (Shapira, 2001). La salud mental es un fenómeno complejo determinado por factores sociales, ambientales, biológicos y psicológicos; constituyendo la cuarta causa de enfermedad, al considerarse causantes de muerte prematura y días vividos con discapacidad (Medina, 2003; Bello, 2005). Incluye padecimientos como depresión, ansiedad, epilepsia, demencia, esquizofrenia, y trastornos del desarrollo en la infancia.

Al menos 15 millones de mexicanos son víctimas de trastornos de ansiedad en algún momento de su vida, que al no ser detectado a tiempo y manejado adecuadamente ocasiona que la enfermedad se desarrolle, incapacite al paciente e incluso culmine con el suicidio. De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud la prevalencia de ansiedad entre los mexicanos es del 28.6% (García-Tortoriello, 2013).

La ansiedad, de manera natural, es una emoción que permite al individuo prepararse para responder a cambios del medio ambiente; no obstante, cuando sobrepasa el umbral emocional se vuelve patológica e interfiere de manera negativa con las actividades cotidianas de quienes la padecen (Bouton et al., 2001). Los trastornos de ansiedad se caracterizan por generar cambios motores, irritabilidad, agresividad, sensación de vulnerabilidad, vigilancia exacerbada y reacciones emocionales exageradas ante una situación de peligro; todos estos síntomas son persistentes a través del tiempo e independientes de los estímulos externos que los provocan (Kaplan et al., 2004).

De acuerdo con la Food and Drug Administration (FDA), las benzodiazepinas (agonistas indirectos del receptor GABA_A) son los fármacos de elección para el tratamiento de la ansiedad. Sin embargo, su consumo crónico produce tolerancia, dependencia y la interrupción brusca del tratamiento induce un síndrome de abstinencia (Ballenger, 1998). Es por esto que la búsqueda y el desarrollo de fármacos con propiedades ansiolíticas que produzcan un mínimo de reacciones adversas es de interés continuo.

En el 2011 se documentó que en la Ciudad de México hubo un aumento en el uso de medicina alternativa entre personas con trastornos psiquiátricos como la ansiedad. En este

caso, se observó que ante un malestar emocional, el 52.5% del total de la muestra realizó alguna práctica de autocuidado y el 28.2% recurrió a sistemas alternativos (Berenzon et al., 2009). Dentro de las terapias alternativas, destacan la herbolaria o medicina tradicional. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) la medicina tradicional incluye toda medicación hecha a base de hierbas o preparados que contienen ingredientes activos de plantas cuyo uso, a través de los años, ha sido ampliamente reconocido como eficaz (OMS, 2002-2005). El tratamiento de la enfermedad por medio de las propiedades curativas de las plantas fundamenta una ciencia conocida como fitomedicina (OMS, 2000). Aunque las plantas con propiedades ansiolíticas han sido empleadas por el hombre desde la antigüedad, es hasta hoy en día que su uso está ganando aceptación en el campo de la psiquiatría (Sollozo-Dupont, 2011), siendo una opción importante de respuesta ante las necesidades crecientes de atención a la salud mental pero que cuenta con poca evidencia científica que garantice su eficacia y seguridad (OMS, 2000).

Es importante destacar que un gran porcentaje de pacientes suelen combinar la prescripción médica de benzodiazepinas con productos de especies vegetales, muchas veces sin consultar a su médico. El riesgo que conlleva la doble medicación es que las plantas pueden interactuar con estos fármacos antagonizando o potenciando sus efectos centrales (Barnes et al., 2002). Aunque el uso de plantas y de preparados naturales es una práctica común y goza de aceptación creciente a nivel mundial, profundizar en el conocimiento de muchas de las especies vegetales utilizadas en psiquiatría, es sin duda una de las grandes tareas académicas que requieren de atención (Eisenberg et al., 1993).

En general, la comprobación de la seguridad, calidad y eficacia de las plantas medicinales y productos herbales debe ser un tema clave para la salud, tanto en países industrializados, como para los que se encuentran en vías de desarrollo (Kumar & Bhatnagar, 2006). En este trabajo se propone determinar la actividad ansiolítica y/o sedante de los extractos orgánicos y acuoso de *L. graveolens* utilizando diferentes modelos experimentales en roedores.

1. Marco teórico

1.1 Ansiedad.

La ansiedad es un fenómeno psíquico universal que todos experimentamos en mayor o menor medida en la vida cotidiana, pudiendo considerarse que existe una ansiedad normal, adaptativa que sirve para prepararnos y responder en las mejores condiciones posibles ante circunstancias amenazadoras o de riesgo.

Cuando la ansiedad no es adaptativa y el nivel de activación, así como su duración, es desproporcionada con respecto a la situación objetiva hablamos de ansiedad patológica. Siendo así un fenómeno complejo en el que participan múltiples factores como genéticos, de personalidad, psicológicos y biológicos, dentro de estos últimos el más importante son los neurotransmisores, dentro de los cuales los más importantes son el ácido gamma-aminobutírico (GABA), la noradrenalina y la serotonina (García,1999).

1.1.1 Tipos de ansiedad.

Los trastornos por ansiedad, se clasifican dependiendo de la intensidad y duración de su sintomatología, dividiéndolos en: trastorno por angustia con agorafobia o sin ella, agorafobia sin historia de trastorno por angustia, fobia específica, fobia social, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por estrés postraumático, trastorno por estrés agudo y trastorno de ansiedad generalizada (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de los trastornos por ansiedad. (Pichot, 1994)

Trastorno	Características
Angustia sin agorafobia	Crisis de angustia recurrentes e inesperadas que causan preocupación permanente en el paciente.
Angustia con agorafobia	Crisis de angustia y agorafobia de carácter recurrente e inesperado que causan ansiedad.
Agorafobia sin historia de trastornos de angustia	Ansiedad al encontrarse en lugares o situaciones donde escapar puede ser difícil o embarazoso, pero sin la presencia de crisis de angustia.
Fobia específica	Ansiedad como respuesta a la exposición a situaciones u objetos específicos temidos, que conllevan a comportamiento de evitación.
Obsesivo compulsivo	Obsesiones que causan ansiedad, malestar y compulsiones cuyo propósito es neutralizar dicha ansiedad.
Estrés postraumático	Ansiedad ante la re experimentación de eventos traumáticos y comportamiento de evitación hacia estímulos relacionados con el trauma.
Estrés agudo	Ansiedad y malestar que aparecen inmediatamente después a un acontecimiento traumático.
Ansiedad generalizada	Ansiedad y preocupación de carácter excesivo y persistente.
Fobia social	Ansiedad como respuesta a situaciones sociales o actuaciones en público, que conllevan a comportamiento de evitación.

1.1.2 Terapéutica de la ansiedad.

En el campo del tratamiento de la ansiedad, las benzodiacepinas, son usadas como fármacos de primera elección en estados de ansiedad aguda, sin embargo fallan en estados de ansiedad crónica y han sido paulatinamente desplazadas por los antidepresivos que no solo son eficaces en el tratamiento de la depresión sino que también en el tratamiento a largo plazo de trastornos de ansiedad (García, 1999). A continuación se muestran los fármacos más utilizados en el tratamiento contra la ansiedad (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tipos más frecuentes de fármacos utilizados para los trastornos de ansiedad.
(Antai-Otong, 2007).

Tipo de fármacos	Ejemplos	Acción que ejercen	Controla síntomas como:
Benzodiacepinas	Alprazolam Clonazepam Diazepam Lorazepam	Alivian crisis ansiosas	Somnolencia, cansancio, deterioro de la coordinación.
Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina	Citalopram Escitalopram Fluoxetina Fluvoxamina Paroxetina Sertralina	Restablece el equilibrio normal de serotonina en el cerebro, aliviando los síntomas de ansiedad o depresión	Depresión, mareos, cefaleas, trastornos del sueño, disfunción sexual, temblores o convulsiones.
Inhibidores de la recaptación de noradrenalina y serotonina	Venlafaxina Duloxetina	Restablece el equilibrio normal de serotonina y noradrenalina en el cerebro, aliviando los síntomas de ansiedad o depresión	Depresión, presión arterial elevada, cefaleas, insomnio, problemas sexuales, sudoración, sensación de sueño.
Antidepresivos tricíclicos	Clomipramina Imipramina Nortriptilina	Restablece el equilibrio normal de serotonina y/o noradrenalina en el cerebro, aliviando los síntomas de ansiedad o depresión	Latidos cardíacos irregulares, mareos, somnolencia, sequedad de la boca, temblores o convulsiones.

Debido a la limitada eficacia, acompañada de numerosas reacciones adversas, de los fármacos ansiolíticos y antidepresivos actualmente en uso, ha surgido la necesidad de desarrollar medicamentos más eficaces y mejor tolerados. Lo que ha llevado a que, en los años recientes, se haya reactivado el interés por los productos herbolarios como medicinas alternativas o complementarias en el tratamiento de trastornos psiquiátricos. Esto se ve reflejado en el creciente número de productos naturales que son introducidos en la práctica psiquiátrica cuyo potencial terapéutico ha sido demostrado en modelos experimentales de psicopatologías (Zhang, 2004).

1.2 Herbolaria.

Durante mucho tiempo las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso del que disponía el hombre para la cura de varias enfermedades (Núñez, 1982). Siendo organismos que elaboran sustancias que ejercen una acción farmacológica beneficiosa ó perjudicial para los seres vivos y han sido desde la antigüedad un recurso al alcance del ser humano para la cura de sus enfermedades. En la actualidad cientos de plantas son utilizadas en la medicina.

Las sustancias activas que se encuentran en las plantas son producto de su metabolismo secundario y se encuentran en forma de complejos cuyos componentes se complementan y refuerzan su acción sobre el organismo. Estas sustancias activas presentan un equilibrio fisiológico dentro de la planta y el organismo, debido a ello resultan más asimilables por el cuerpo y carecen de efectos nocivos. Pero la ciencia moderna, analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, no con el fin de disminuir esta confianza en la naturaleza, sino para agrupar plantas de efectos similares, para conocer principios activos responsables de aliviar o curar enfermedades, separarlos de las plantas que los contienen, determinar sus estructuras químicas, procurar su síntesis, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad y finalmente dar a conocer a la humanidad los resultados de los estudios (Vander, 1972).

1.2.1 Plantas con actividad ansiolítica.

El porcentaje de especies estudiadas desde un punto de vista fitoquímico es bajo y es aún menor el número de aquellas evaluadas farmacológicamente para garantizar que el uso que se les da es adecuado y no presentan riesgos para la salud (Martínez, 2005). Para México se han registrado alrededor de 4,000 especies con propiedades medicinales (13% a 15% de su flora total) (Ramamoorthy et al., 1998). Tortoriello y Romero (1992) documenta que especies pertenecientes a la familia Rutaceae, Tiliaceae y Lamiaceae son frecuentemente utilizadas para el tratamiento de problemas relacionados con el sistema nervioso central (SNC). De acuerdo a la información etnobotánica publicada por el Instituto Mexicano del Seguro Social en 1994 sobre las plantas con uso medicinal en México, se tiene una lista de

plantas ansiolíticas que incluye las plantas usadas para nervios, estrés, insomnio (o que inducen el sueño) y sedativas (Cuadro 3).

Cuadro 3 Plantas utilizadas en la Medicina Tradicional Mexicana para el tratamiento de la ansiedad. (IMSS, 1994).

FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE COMÚN
APOCYNACEAE	<i>Cataranthus roseus</i> G. Don.	Maravilla
	<i>Tabernaemontana divaricata</i> (L.) R. Br. Britton & Rose	Jazmín
BIGNONIACEAE	<i>Crecentia alata</i> Kunth	Cirial
COMPOSITAE	<i>Achillea millefolium</i> L.	Plumajillo
	<i>Artemisia absinthium</i> L.	Hierba maestra
CUCURBITACEAE	<i>Sechium edule</i> (Jacq.) Swartz.	Chayote
LABIATAE	<i>Agastache mexicana</i> (Kunth) Lint & Epling	Toronjil
	<i>Agastache mexicana</i> (Kunth) Lint & Epling. ssp. <i>xolocotziana</i>	Toronjil blanco
	<i>Hedeoma drumondii</i> Benth.	Poleo
	<i>Hesperozygis marifolia</i> (S. Schauer) Epling	Pole
	<i>Marrubium vulgare</i> L.	Manrubio
	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Albahaca morada
	<i>Salvia elegans</i> Vahl.	Mirto macho
	<i>Salvia fulgens</i> Cav.	Mirto macho
	<i>Salvia microphylla</i> Kunth	Mirto
	<i>Indigofera suffruticosa</i> Mill.	Chojxiu (maya)
	<i>Mimosa púdica</i> L.	Dormilón
<i>Tephrosia cinérea</i> (L.) Pers.	Chojxiu de guía (maya)	
MAGNOLIACEAE	<i>Magnolia dealbata</i> Zucc.	Magnolia
	<i>Magnolia grandiflora</i> L.	Magnolia
PASSIFLORACEAE	<i>Passiflora quadrangularis</i> L.	Flor de la pasión
PHYTOLACCACEAE	<i>Rivinia humilis</i> L.	Chilpanxiuitl (náhuatl)
ROSACEAE	<i>Exostema caribaeum</i> (Jacq.) Roem. & Schult.	Quina
	<i>Coffea arabica</i> L.	Café
	<i>Malus sylvestris</i> Mill.	Manzana
RUTACEAE	<i>Casimiroa edulis</i> La Llave & Lex.	Zapote
	<i>Casimiroa sapota</i> Oerst.	Zapote blanco
	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle.	Flor de azahar, lima.
	<i>Citrus aurantium</i> L.	Naranja agrio

	<i>Citrus limon</i> (L.) burm. f	Lima limón
	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.	Naranja dulce
	<i>Murraya paniculata</i> (L.) Jacq.	Limonaria
	<i>Ruta chalepensis</i> L.	Ruda
SAPINDACEAE	<i>Serjania racemosa</i> Schumach.	Nueve hojas
SOLANACEAE	<i>Brugmansia arborea</i> (L.) Steud.	Florifundio
STERCULIACEAE	<i>Chiranthodendron pentadactylon</i> Larreat.	Flor de manita
THEACEAE	<i>Ternstroemia sylvatica</i> Schltld. & Cham.	Tila, tilia, flor de tila
TILIACEAE	<i>Tilia mexicana</i> var. <i>occidentalis</i> Schltld.	Flor de Tila
	<i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> Schltld.	Tilia de hoja, sirimo
VALERIANACEAE	<i>Valeriana prionophylla</i> Standl.	Valeriana

1.2.2 Estudios preclínicos de plantas con propiedades ansiolíticas.

La utilización de los modelos animales o estudios preclínicos ha servido no solo como método de tamizaje de plantas potencialmente eficaces y seguras, sino que también permite validar científicamente el uso en medicina popular de estos productos.

La medicina popular de muchas regiones del mundo ha recurrido desde siempre a las plantas medicinales para aliviar trastornos afectivos o emocionales. La limitada eficacia de los fármacos ansiolíticos actualmente en uso, ha llevado a que en los años recientes se haya reactivado el interés en los productos herbolarios como medicinas alternativas o complementarias en el tratamiento de trastornos psiquiátricos. Además, la búsqueda y desarrollo de nuevas terapias de trastornos psiquiátricos basadas en plantas medicinales ha progresado también significativamente en las últimas décadas (Zhang, 2004; Babic, 2007.).

A continuación se mencionan las plantas medicinales que han mostrado efectos ansiolíticos significativos en modelos animales (Cuadro 4).

Cuadro 4 Plantas medicinales que han mostrado efectos ansiolíticos en modelos animales.
(Zhang, 2003)

Nombre científico	Parte usada	Tipo de extracto y dosis empleada.	Compuestos activos	Modelo evaluado
<i>Abies pindrow</i> Royle	Hojas	Extractos etanólicos 50-100 mg/kg		EPM, OFT.
<i>Annona cherimola</i> Mill.	Hojas	Extracto hexánico 6.25, 12.5. 25 y 50 mg/kg	Palmitona Triterpeno (β -sitosterol)	Prueba de luz/oscuridad y enterramiento defensivo.
<i>Annona diversifolia</i> Saff.	Hojas	Extracto etanólico	Acetona(palmitona)	Prueba de nado forzado
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	Hoja	Extracto acuoso 10-800 mg/kg		EPM, OFT
<i>Cassia siamea</i> Lam.	Hoja	Extracto acuoso 1-12 g/kg Barakol : 10 mg/kg, i.p.	Barakol	EPM
<i>Cecropia glaziouri</i> Sneth	Hoja	Extracto acuoso 0.25-1 g/kg	flavonoides	EPM
<i>Clitoria terneata</i> L.	Raíz	Extracto metanólico 100-400 mg/kg		EPM
<i>Davilla rugosa</i> Poiret	Tallo	Extracto hidroalcohólico 7.5-60 mg/kg		EPM, OFT
<i>Euphoria longana</i> Lam.	Pulpa	Extracto acuoso 2g/kg Adenosina 30 mg/kg	Adenosina	VCT
<i>Eurycoma lonfifolia</i> Jack.	Raíz	Extractos mixtos 0.3 g/kg	Quasinoides	EPM, OFT.
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Hoja	GAC : 0.3-0.6 mg/kg	Ácido Linoleico conjugado (CLA)	EPM, OFT, SI.
<i>Hypericum perforatum</i> L. (Saint John`s wort)	Parte aérea	HP LI 160 : 62.5-500 mg/kg	HP LI 160	EPM,OFT, SI.
<i>Kielmeyera coriacea</i> Mart.	Hoja	Extracto Hidroalcohólico 120 mg/kg		EPM
<i>Magnolia officinalis</i> Rehd. Et Wils	Hoja	Honokiol 0.1-20 mg/kg Magnolol 0.1-80 mg/kg	Honokiol Magnolol	EPM
<i>Matricaria recutita</i> L.	Flor	Apigenina 1-25 g/kg	Apigenina	EPM
<i>Melissa oficinalis</i> L.	Parte aérea	Extracto acuoso 5-100 mg/kg		EPM, OFT.

<i>Passiflora incarnata</i> L.	Parte axial	Extracto metanólico 0.1-0,3 mg/kg Crisina 0.3-60 mg/kg.	Crisina	EPM
<i>Piper methysticum</i> L. Forster (Kava-kava)	Toda la planta	LI 150 30-240 mg/kg	Kavalactona LI150	EPM, SI
<i>Rubus brasiliensis</i> Mart.	Flores	Extractos hexánico y etanólico 50-150 mg/kg		EPM
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi.	Raíces	Wogonina 3.75-30 mg/kg Baicaleína 10 mg/kg, i.p. Baicalina 20 mg/kg, i.p.	Wogonina Baicaleína Baicalina	EPM, VCT.
<i>Tilia tomentosa</i> Moench	Parte aérea y raíces	Crisina : 1 mg/kg, i.p.	Chrysina Kaempferol Glycowithanolides	EPM, SI.
<i>Valeriana officinalis</i> L.	Aceites esenciales (beta-cariofileno, valeranona, valerenalo)	Extracto etanólico 100 mg/kg	Camferol	Cilindro y campo abierto
<i>Ziziphus jujube</i> Mill	Fruto maduro	Extracto etanólico : 0.5-2 g/kg	Espinolina Jujubosides	EPM, prueba luz obscuridad

EPM: Por sus siglas en inglés Elevated Plus Maze

OFT: Por sus siglas en inglés Open Field Test

VCT: Por sus siglas en inglés Vogel Conflict test

SI: Por sus siglas en inglés Social Interaction

1.3 *Lippia graveolens* Kunth.

L. graveolens (Fig. 1) también conocida como mejorana, orégano de monte u orégano es un arbusto que mide de 45 cm hasta 1.80 metros de alto. La planta tiene sus tallos ramificados con gran cantidad de hojas, las cuales miden entre 2 a 5 cm de largo, son opuestas y de forma ovalada con bordes dentados y tienen una textura rugosa y con ligeras vellosidades; las flores son pequeña, de color blanco y forman inflorescencias en racimos; los frutos son

pequeñas capsulas que contienen las semillas de color pardo, no mayores de 0.25 mm (Huerta, 1997).

Con el nombre de orégano se conocen aproximadamente 40 especies de plantas herbáceas pertenecientes a cuatro familias botánicas (Cuadro 5): Asteraceae, Fabaceae, Lamiaceae y Verbenaceae reconocidas (Huerta, 1997; Kintzios, 2002).

La característica que los distingue es el aroma y sabor. La mayoría son especies que poseen notables propiedades medicinales que se explican por la compleja composición química que presentan. En la práctica terapéutica las especies de orégano europeas (*Origanum* spp.) y las mexicanas (*Lippias* sp.) son las más utilizadas.

Fig. 1 *L. graveolens*



Cuadro 5 Principales especies conocidas en México como Orégano. (Huerta, 1997).

Nombre científico	Familia	Nombres comunes y distribución geográfica
<i>Brickelia veronicaefolia</i> Kunth.	Asteraceae (Compuesta)	Orégano de cerro (Chih.) Orégano de campo (Méx.) Orégano de monte (Pue.)
<i>Calamiutha potosina</i> Schaff.	Labiatae	Orégano de sierra (S.L.P.)
<i>Dalea greggi</i> Gray	Fabaceae (Leguminosae)	Orégano cimarrón (Chih., Oax. Pue., S.L.P., Son.)
<i>Gardoquia micromerioides</i> Hemsl (Schaffner)	Labiatae	Orégano (S.L.P.)
<i>Hedeoma floribunda</i> Standl.	Labiatae	Orégano (Chih., S.L.P., Son.)
<i>Hedeoma patens</i> Jone	Labiatae	Orégano (Chih., S.L.P., Son.)
<i>Hyptis albida</i> Kunth.	Labiatae	Orégano salvia real (Ags., Chis., Gro., Gto., Jal., Pue., Sin., Son.)
<i>Lantana involucrata</i> L.	Verbenaceae	Orégano peonia colorada, Tarete (Mich., Sin., Tamps.)
<i>Lantana velutina</i> Mart.	Verbenaceae	Orégano (Gto., S.L.P., Tamps.)
<i>Lippia berlandieri</i> Schauer	Verbenaceae	Orégano de castilla, salvia (Coah., Dgo., Jal., Qro., Sin., Zac.)
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	Verbenaceae	Orégano (Camp., Yuc.)
<i>Lippia palmeri</i> Watson	Verbenaceae	Orégano (B.C., Chih., Sin., Son.)
<i>Monarda austromontana</i> Epl.	Labiatae	Orégano (Chih., Son.)
<i>Monarda citricodora</i> Cerv.	Labiatae	Orégano (Chih., N.L., Son.)
<i>Origanum mejorana</i> L.	Labiatae	Orégano europeo (zonas templadas de México, huertos familiares)
<i>Origanum vulgare</i> L.	Labiatae	Orégano europeo (zonas templadas de México, parcelas y huertos familiares)
<i>Poliomintha longiflora</i> Gray.	Labiatae	Orégano (Coah., N.L.)

1.3.1 Distribución.

L. graveolens se distribuyen en América desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y en algunas regiones de África. Se localiza en bosques secos y montes espinosos subtropicales, en pendientes pedregosas muy secas, en matorrales húmedos o secos y planicies de hasta 350 m de altitud. En México se encuentra en estado silvestre, en regiones áridas y semiáridas de varios estados de la República como Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, Veracruz, Oaxaca, Sinaloa, Jalisco, Zacatecas, Querétaro, Hidalgo, Durango y Guerrero (Fig. 2) (Villavicencio et al., 2007).

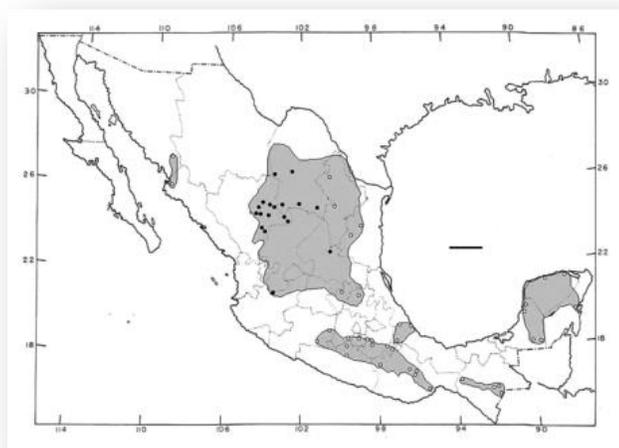


Fig. 2 Distribución de *L. graveolens* en México (Sánchez et al., 2007).

1.3.2 Etnobotánica.

Los usos de esta especie son: como analgésico, antiinflamatorio, antipirético; contra diarrea, vómito, indigestión y disentería (Monroy & Castillo, 2000). También es utilizada como antialérgico, antiviral, vasodilatador y antihipertensivo (Pietta, 1999; Guerrero et al., 2002), como antifúngico, antiparasitario, y antimicrobiano en infecciones cutáneas, gástricas y respiratorias (Pascual et al., 2001; Skandamis et al., 2002; Burt & Reinders, 2003; Bassole et al., 2003; Hernández et al., 2008; Hernández et al., 2009). Espasmolítico y estrogénico (Craker & Simon, 1992; De las Heras et al., 1998; Pérez, 2002). Esta especie también es utilizada en el tratamiento de desórdenes hepáticos, diuréticos, menstruales,

antimalaria. Contra sífilis, gonorrea y diabetes (Socorro et al., 1998; Arcila-Lozano et al., 2004).

Por su acción antiséptica, digestiva y expectorante se indica su uso por vía oral para el tratamiento de inapetencia, digestión lenta, tos, faringitis, sinusitis, bronquitis y amenorrea. Se recomienda administrar tres veces al día en dosis de 2-4 g en infusión, 1-3 mL de extracto fluido, 4-6 gotas de esencia, 1-2 cápsulas de 50 mg, 0.1-0.4 g en supositorios. Tópicamente se aplican inhalaciones húmedas y aerosoles para tratar afecciones respiratorias. Por sus propiedades antisépticas y cicatrizantes la infusión y esencia en linimento y pomadas están indicadas para tratar heridas y dolores reumáticos; el cataplasma se aplica en los abscesos varias veces al día (Cáceres, 1996).

1.3.3 Química.

Dentro del género *Lippia* se han aislado e identificado principalmente aceites esenciales, terpenoides, irioides y flavonoides (Pascual et al., 2001; Long-Ze et al., 2007; Hennebelle et al., 2008; Maldonado et al., 2010). En el aceite esencial de *L. graveolens* se han identificado los monoterpenos borneol, camfeno, carnacrol, cineol, ρ -cimeno, mirceno, α y β -pineno, terpinenol, α -terpineno, α -terpineol, α -tuyeno y timol; los sesquiterpenos β -cariofileno y humuleno; y el componente fenílico eugenol. En las ramas y la raíz se han identificado los flavonoides naringenina y pinocembrina. Icterogenina y un compuesto heterocíclico de oxígeno, papachenole (Domínguez et al., 1989; Hutchings & Van Staden, 1994). En extractos metanólicos de hojas de *L. graveolens* se han reportado siete iridoides minoritarios conocidos como loganina, secologanina, secoxiloganina, dimetil-secologanosido, ácido logánico, ácido 8-epi-logánico y carioptosido; y tres iridoides mayoritarios como el ácido carioptosídico y sus derivados (Rastrelli et al., 1998). También contiene flavonoides como naringenina y pinocembrina, icterogenina, entre otros (Hutchings, 1994; Wagner, 2003).

1.3.4 Farmacología.

Estudios antibacterianos demuestran que la tintura y la infusión de hojas es activa contra *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*. Los

extractos con diclorometano y etanol son activos contra los hongos *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium gypseum* y *Trichophyton rubrum* (Mendoza, 1995).

Investigaciones toxicológicas muestran que el extracto acuoso y etanólico de hojas de *L. graveolens* a concentraciones de 500 ppm presentan toxicidad contra peces del género *Mollinesia*. Su administración durante el embarazo está contraindicada, ya que puede producir aborto. Se ha probado también la actividad anticancerígena (Mendoza, 1995).

2. Justificación.

L. graveolens es una hierba aromática que se distribuye en México y crece como una especie silvestre, se utiliza comúnmente como condimento en la cultura gastronómica mexicana pero además como hierba curativa desde las antiguas culturas prehispánicas (Nakatani, 1992; Pascual et al., 2001). En la actualidad se conocen diversos estudios acerca de la composición química de esta especie y sus propiedades farmacológicas como antibacteriano, antifúngico y espasmódico; sin embargo, no se han realizado estudios que corroboren sus efectos depresores del SNC para disminuir el insomnio, estrés y en general las crisis de ansiedad, usos para los cuales también se aplica en la medicina tradicional. En el presente proyecto se propone determinar la actividad ansiolítica y/o sedante de diferentes extractos orgánicos y el acuoso de las hojas de *L. graveolens* utilizando modelos experimentales de ansiedad y sedación en ratones e identificar al menos un metabolito en el extracto activo.

3. Objetivo.

3.1 General.

Determinar la actividad ansiolítica y /o sedante de los extractos orgánicos y acuoso de *L. graveolens*.

3.1.1 Particulares.

1. Obtener los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico de hojas de *L. graveolens*
2. Obtener el extracto acuoso de hojas de *L. graveolens*.
3. Evaluar el efecto ansiolítico y sedante de extractos orgánicos y acuoso de *L. graveolens* mediante el uso de los modelos experimentales de campo abierto, tablero con orificios, cilindro de exploración y cruz elevada.
4. Demostrar la interacción depresora de los extractos de *L. graveolens* en la potenciación a la hipnosis inducida por pentobarbital sódico.
5. Evaluar la toxicidad mediante el cálculo de la dosis letal cincuenta (DL50) de los extractos de *L. graveolens*.
6. Aislar e identificar al menos un metabolito en el extracto activo.

4. Hipótesis.

Si los extractos de *L. graveolens* poseen actividad depresora del SNC entonces producirán disminución en las conductas de ansiedad y aumento de la sedación en ratones.

5. Materiales y método

5.1 Material vegetal.

L. graveolens fue colectada en el Km 45 al sur del municipio de Abasolo, Tamaulipas y determinada por el Dr. José Martínez Ávalos del Instituto de Ecología y Alimentos-UAT, depositando un ejemplar en el Herbario de la misma institución con Número de Boucher 1786 (Fig. 3).



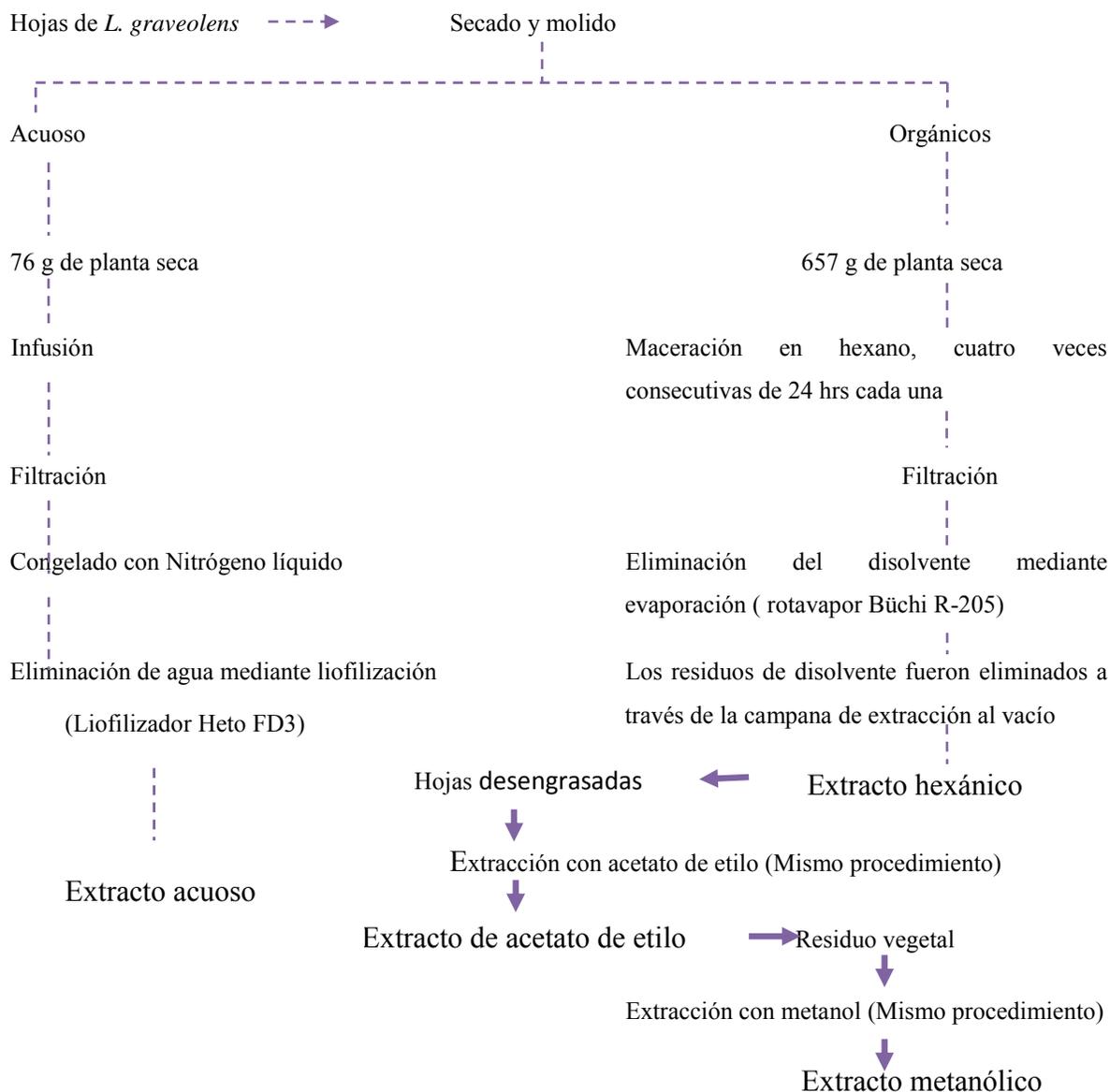
Fig. 3 Colección de herbario *Lippia graveolens* Kunth

5.2 Obtención de extractos.

Las hojas de *L. graveolens* fueron secadas a temperatura ambiente y molidas finamente. El material vegetal pulverizado se sometió a cuatro extracciones sucesivas en maceración durante 24 horas cada una, utilizando tres disolventes orgánicos de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo y metanol) en orden ascendente de polaridad. El exceso de disolvente se eliminó en un rotavapor Büchi R-205 y finalmente, una vez seco el extracto se pesó para calcular su rendimiento.

En el caso del extracto acuoso, 76 g del material vegetal pulverizado fueron utilizados para preparar una decocción en la siguiente proporción: por cada 10 g de material vegetal se le adicionaron 90 mL de agua destilada, los cuales se dejaron en ebullición durante 5 minutos. Dicho extracto acuoso se separó de sus residuos por filtración por gravedad y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para proceder a la eliminación del agua en un liofilizador Heto FD3. En la Figura 4 se ilustra el diseño experimental que se siguió para la obtención de los extractos orgánicos y acuoso.

Fig. 4 Diagrama metodológico de la obtención de los extractos orgánicos y acuoso de *L. graveolens*.



Una vez obtenidos los extractos se llevó a cabo la evaluación farmacológica para determinar cuál sería el extracto activo y así proceder al análisis fitoquímico del mismo e identificar al menos un metabolito activo.

5.3 Animales.

Machos de la cepa CD1 (25-30 g Fig. 5) se colocaron en cajas de acrílico en grupos de 10, sin restricción de alimento y agua, mantenidos a una temperatura controlada de 22°C con ciclo de luz/oscuridad de 12 h y siguiendo las recomendaciones de los comités de ética e investigación científica y la NOM-062-Z00-1999.



Fig. 5 Ratones machos CD1

5.4 Administración de los tratamientos.

Los extractos hexano y acetato de etilo se resuspendieron con tween 80 al 0.5% en solución salina al 0.9%, mientras que para la administración del extracto metanólico, acuoso y pentobarbital sódico se utilizó sólo solución salina al 0.9%. Tanto los fármacos como los extractos se utilizaron de reciente preparación. La evaluación se llevó a cabo con las dosis de 1, 3, 10, 30 y 100 mg/kg de extracto crudo, la vía de administración fue intraperitoneal(Fig. 6).



Fig. 6 Administración vía intraperitoneal de los extractos a evaluar de *L. graveolens*.

5.5 Evaluación farmacológica.

En cada una de las pruebas se utilizaron 6 ratones por cada tratamiento, en comparación con un grupo control y un grupo al que se le administró el fármaco de referencia diazepam (DZP) en la dosis de 0.1 mg/kg. Tanto los extractos, como el DZP se evaluaron 45 min después de la administración. Una vez terminadas las pruebas, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical.

5.5.1 Evaluación de la actividad ambulatoria.

Campo abierto.- Los ratones se colocaron de manera individual en una caja de acrílico con 12 divisiones (cuadrados de 6 x 6 cm) y se registró durante 2 minutos el número de cuadros explorados por cada ratón para analizar la actividad ambulatoria (Fig. 7).

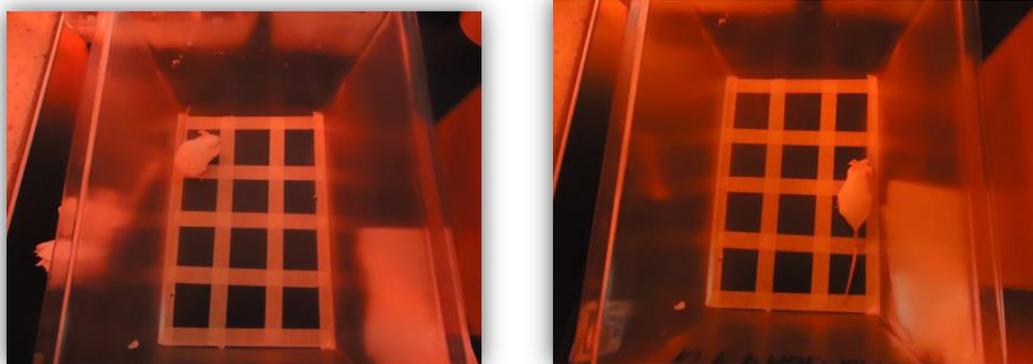


Fig. 7 Modelo de campo abierto

5.5.2 Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante.

1. Prueba de tablero con orificios (“hole-board”).- Este modelo consiste de una caja de acrílico con un piso de madera con orificios distribuidos uniformemente. Los ratones se colocaron sobre el tablero y se contó el número de veces que los animales introdujeron su cabeza en los orificios por un periodo de tres minutos (Fig. 8).



Fig. 8 Modelo del tablero con orificios

2. El modelo de exploración en cilindro.- En esta prueba el ratón fue colocado dentro de un cilindro de vidrio (20 cm de altura x 13 cm de diámetro x 5 mm de grosor) y se contó durante 5 minutos el número de veces que el animal se para sobre sus extremidades posteriores apoyando las extremidades anteriores en la pared del cilindro (Hiller & Zetler, 1996) (Fig. 9).



Fig. 9 Modelo del cilindro

3. El modelo de cruz elevada (plus-maze).- Este aparato esta hecho de madera y consta de una cruz elevada con dos brazos abiertos de 30 x 5 cm y dos brazos cerrados de 30 x 5 x 15 cm. Dichos brazos se extienden a partir de una plataforma central de 5 x 5 y se encuentran elevados a 50 cm del suelo. Los ratones fueron colocados en la parte central y se cuantificó el número de entradas y el tiempo que los animales permanecen en los brazos abiertos o cerrados durante 5 minutos (Fig. 10).

Fig. 10 Modelo de cruz elevada.



5.5.3 Potenciación de la hipnosis inducida por pentobarbital sódico.

En esta prueba se determina si hay sinergismo entre la sustancia de prueba con supuesta actividad depresora del SNC y un fármaco de actividad depresora conocida como el sedante-hipnótico PS en dosis de 40 mg/kg i.p. (González-Trujano, 1998). Se observa el tiempo en que inicia el efecto sedante e hipnótico después de la administración (latencia de sedación y latencia de hipnosis), es decir el tiempo que tarda el animal en presentar incoordinación motora y perdida del reflejo postural, respectivamente; así como la duración del sueño que es el tiempo que transcurre entre la latencia de hipnosis y la recuperación de la postura. En general las sustancias con actividad hipnótica reducen las latencias y/o aumentan la duración del sueño.

5.5.4 Determinación de la DL₅₀.

Para determinar la dosis que produce la muerte en el 50% de los sujetos (DL₅₀) se utilizó el método descrito por Lorke (1983) con modificaciones. Para ello se probó la dosis de 2000 mg/kg como máxima e inicial, si se presentó toxicidad o muerte a esta dosis entonces se redujo a las dosis de la primera fase establecida por el método de Lorke (10, 100 y 1000 mg/kg). Después de la administración de los extractos se observaron durante 14 días posibles efectos tóxicos tales como: pérdida de la locomoción, paro respiratorio y muerte.

5.6 Análisis estadístico.

Los datos se presentan como la media \pm el error estándar de la media a los que se aplicó análisis de varianza (ANDEVA) de una vía seguido de la prueba de Dunnett para la comparación contra el control. Se utilizó el programa Sigma Stat versión 3.5.

5.7 Separación, purificación e identificación de los compuestos puros de los extractos de acetato de etilo, metanol y acuoso.

Los componentes de los extractos de acetato de etilo y metanol se separaron por cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice para cromatografía en placa fina Macherey-Nagel Ref. 816310.1.

5.7.1 Extracto de acetato de etilo.

El extracto de acetato de etilo (70 g) se eluyó primero con hexano y la polaridad se aumentó gradualmente con acetato de etilo hasta eluir con 100% de este último disolvente. Tanto las fracciones obtenidas como los sistemas de elución se muestran en la (Cuadro 6). Se obtuvieron 206 fracciones de 100 mL cada una, las cuales se reunieron por su similitud en cromatografía en capa fina.

Cuadro 6. Fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas
Hexano	100%	1-7
Hexano-AcOEt	9:1	8-20
Hexano- AcOEt	8:2	21-34
Hexano- AcOEt	7:3	35-83
Hexano- AcOEt	6:4	84-106
Hexano- AcOEt	1:1	107-120
Hexano- AcOEt	4:6	121-136
Hexano- AcOEt	3:7	137-150
Hexano- AcOEt	2:8	150-172
Hexano- AcOEt	1:9	173-191
AcOEt	100%	192-206

5.7.2 Extracto metanólico.

El extracto metanólico (160 g) se separo en una columna cromatográfica utilizando como eluyente mezclas de hexano, AcOEt y MeOH en distintas proporciones y en aumento de grado de polaridad. En total se obtuvieron 275 fracciones de 100 mL cada (Cuadro 7). Por cromatografía en capa fina se detectó la complejidad y pureza de cada fracción, reuniendo las fracciones semejantes.

Cuadro 7. Fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones obtenidas
Hexano-AcOEt	7:3	1-30
Hexano-AcOEt	6:4	31-65
Hexano- AcOEt	1:1	66-88
Hexano- AcOEt	4:6	89-105
Hexano- AcOEt	3:7	106-133
Hexano- AcOEt	2:8	134-145
Hexano- AcOEt	1:9	146-164
AcOEt	100%	165-198
AcOEt- MeOH	9:1	199-230
AcOEt- MeOH	8:2	231-263
AcOEt- MeOH	7:3	264-271
MeOH	100%	272-275

5.7.3 Purificación e identificación de los compuestos.

Los metabolitos individuales se purificaron mediante la técnica de cristalización y ya puros se les determinó el punto de fusión en un equipo Fisher Johns. Posteriormente fueron enviados al Instituto de Química de la UNAM donde se les realizó los siguientes análisis: difracción de rayos-X, RMN-¹H y ¹³C en un espectrómetro Bruker, Avance DPX400 MHz, adquiridos a 300 MHz y 75 MHz respectivamente. Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de masas Jeol, The AccuTOF JMS-T100LC, método FAB positivo. Los espectros se muestran en los anexos.

Una vez identificados los compuestos aislados, se realizaron nuevamente las pruebas farmacológicas con cada uno de ellos. Cada compuesto fue disuelto en solución salina al 0.9% y administrados en dosis de 3 mg/kg vía i.p. en comparación con un grupo control y un grupo con un fármaco de referencia como lo es el diazepam en dosis de 0.1 mg/kg.

5.7.4 Análisis CLAR del extracto acuoso de *L. graveolens*.

En base a la revisión bibliográfica se sabe que las especies del género *Lippia* sintetizan flavonoides, por lo que su análisis se realizó con un cromatógrafo Agilent 1100 provisto con un detector de UV, columna C18 Hypersil ODS (125 mm x 4 mm d.i., 5 µm de tamaño de partícula). El flujo de la fase móvil se mantuvo a 1 mL / min y consto de acetonitrilo-agua, pH 2.5, en proporción 15:85, a una temperatura de 30 °C. El equipo se calibró a una longitud de onda de 350 nm (Rijke et al., 2006). Se prepararon muestras tomando 5 mg de extracto en 1 mL de metanol grado CLAR, posteriormente 20 µL de la muestra se inyectaron y se analizaron en corridas de 14 minutos. Para la identificación de los flavonoides presentes en los extractos de hojas de *Lippia graveolens* se usaron estándares de canferol, quercetina, rutina, luteolina, naringina, naringenina, isoquercitrina, astragalina, galangina, apigenina y apigenina 7-O glucósido de la marca Sigma. Soluciones con cada uno de los estándares se prepararon en 1 mg/mL de metanol y se inyectaron en 20 µL para determinar los tiempos de retención.

6. Resultados.

6.1 Rendimiento de la preparación de extractos.

A cada uno de los extractos obtenidos se les calculó su rendimiento con base en el peso seco. En el cuadro 8 se observa que los extractos metanólico y acuoso fueron los que presentaron mayor rendimiento (25.74% y 19.73%, respectivamente).

Cuadro 8. Rendimiento de los extractos obtenidos de las hojas de *L. graveolens*.

CANTIDAD (peso seco)	EXTRACTOS			
	Hexano	Acetato de etilo	Metanol	Acuoso (76 g)
657 g	75.84 g	77.30 g	169.12 g	15 g
	(11.54%)	(11.76%)	(25.74%)	(19.73%)

Una vez obtenidos los extractos crudos se procedió a realizar las pruebas farmacológicas con cada uno de ellos.

6.2 Evaluación farmacológica de los extractos crudos (hexano, acetato de etilo, metanol y acuoso) de *L. graveolens*.

6.2.1 Actividad ambuladora.

La actividad farmacológica fue iniciada con la prueba de campo abierto, donde se evalúa la capacidad ambuladora de los ratones, la cual es crucial para poder continuar con la evaluación conductual en los siguientes modelos ya que las conductas son de exploración y se requiere que la actividad de ambulación o exploración del sujeto experimental no esté afectada. Sin embargo, una disminución moderada de la misma se podrá asociar con efectos sedantes. De acuerdo a los resultados se observa que ningún extracto orgánico disminuyó la actividad ambuladora en ninguna de las dosis administradas (Fig. 11-13); mientras que en el extracto acuoso (Fig. 14) se observó disminución significativa en la dosis de 100 mg/kg.

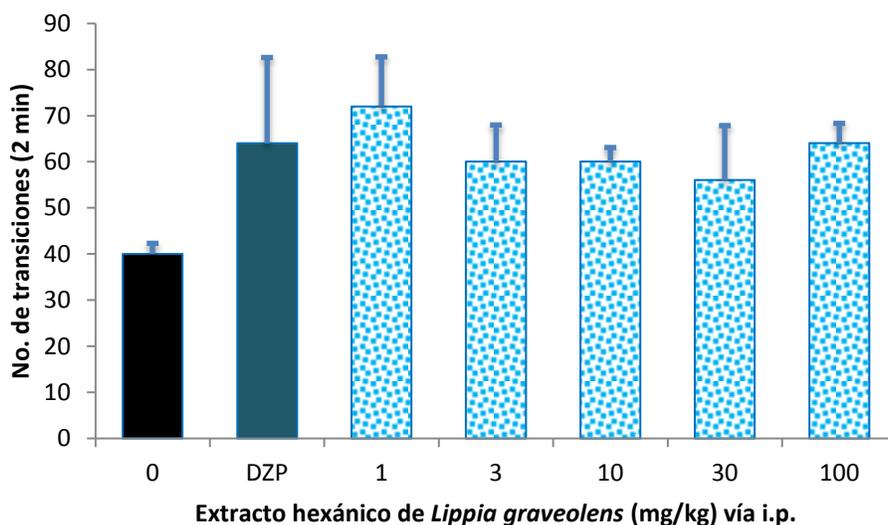


Fig. 11 Evaluación de la actividad ambulatoria del extracto hexánico de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de campo abierto. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales.

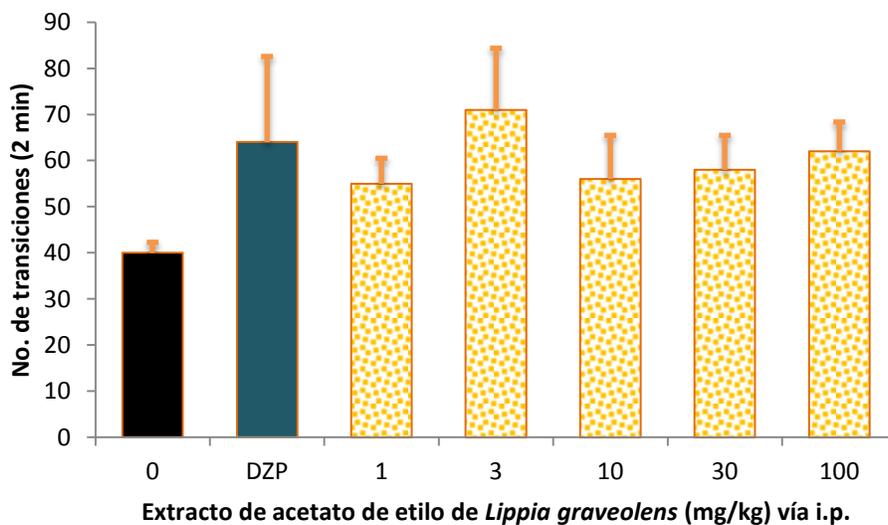


Fig. 12 Evaluación de la actividad ambulatoria del extracto de acetato de etilo de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de campo abierto. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales.

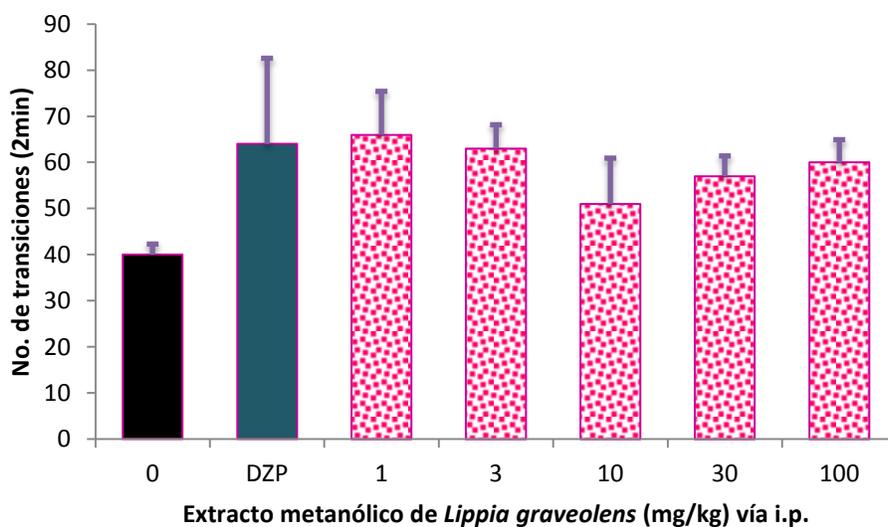


Fig. 13 Evaluación de la actividad ambulatoria del extracto metanólico de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de campo abierto. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales.

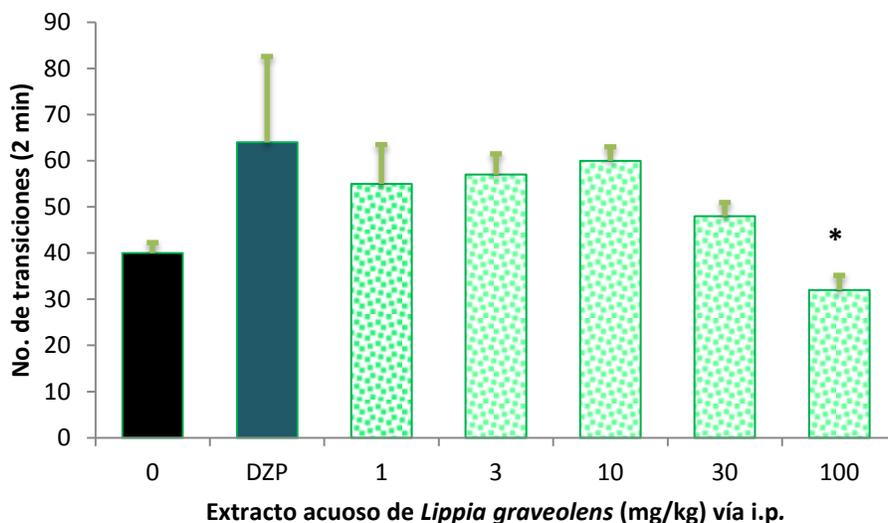


Fig. 14 Evaluación de la actividad ambulatoria del extracto acuoso de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de campo abierto. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales. * $P < 0.05$, ANDEVA seguida de la prueba de Dunnett.

6.2.2 Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante en las pruebas de tablero con orificios, cilindro y brazos abiertos.

1. Tablero con orificios (Hole board).

En esta prueba se contó el número de veces que el ratón introdujo su cabeza dentro de los agujeros, dándonos como resultado una disminución significativa en el número de exploraciones producida con todos los extractos en cada una de las dosis evaluadas; lo cual, de acuerdo a reportes de Clark (1997) es indicativo de efecto tipo ansiolítico (Fig. 15-18).

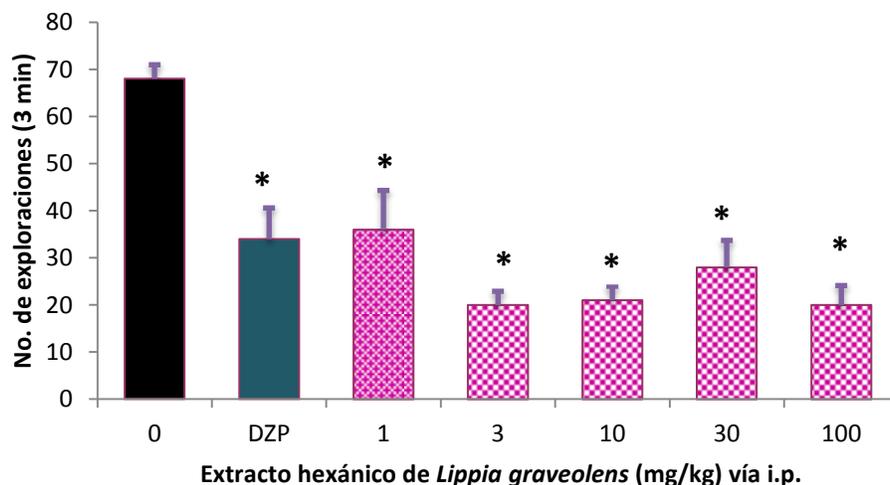


Fig. 15 Evaluación de la actividad ansiolítica y /o sedante del extracto hexánico de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo tablero con orificios. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales. * $P < 0.05$, ANDEVA seguida de la prueba de Dunnett.

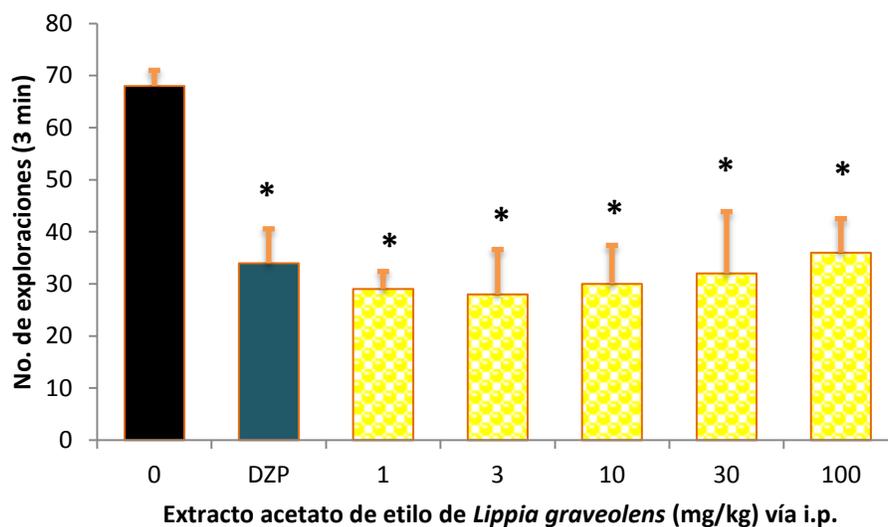


Fig. 16 Evaluación de la actividad ansiolítica y /o sedante del extracto Acetato de etilo de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo tablero con orificios. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales. * $P < 0.05$, ANDEVA seguida de la prueba de Dunnett.

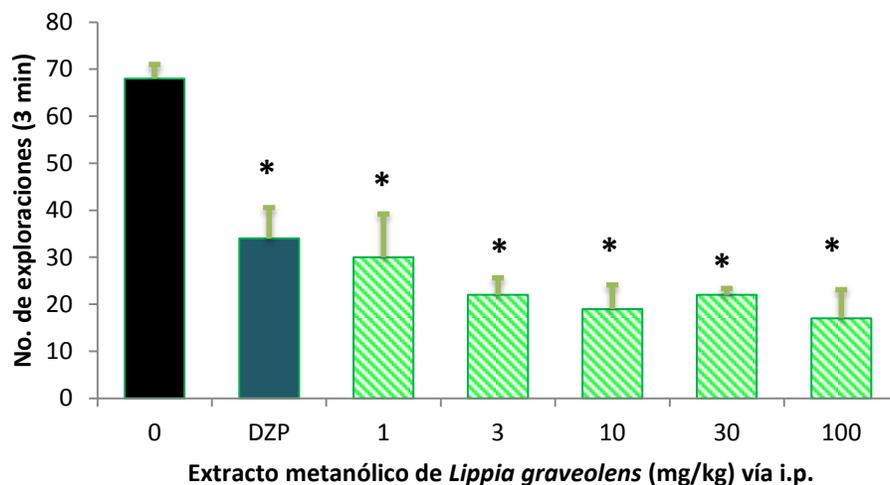


Fig. 17 Evaluación de la actividad ansiolítica y/o sedante del extracto metanólico de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo tablero con orificios. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales. * $P < 0.05$, ANDEVA seguida de la prueba de Dunnett.

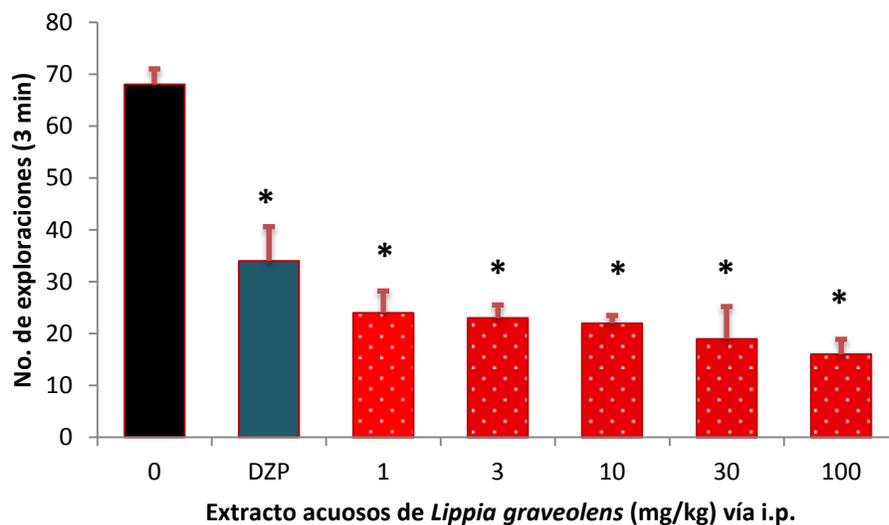


Fig. 18 Evaluación de la actividad ansiolítica y/o sedante del extracto acuoso de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo tablero con orificios. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales. * $P < 0.05$, ANDEVA seguida de la prueba de Dunnett.

2. Cilindro.

Durante esta prueba se contó el número de veces que el ratón se paraba sobre sus patas traseras obteniendo como resultado que sólo el extracto acuoso en la dosis de 100 mg/kg produce la disminución significativa en el número de levantamientos con respecto al control, mientras que para los demás extractos y el fármaco de referencia, en cada una de las dosis administradas, no se presentó diferencia significativa (Fig. 19-22)

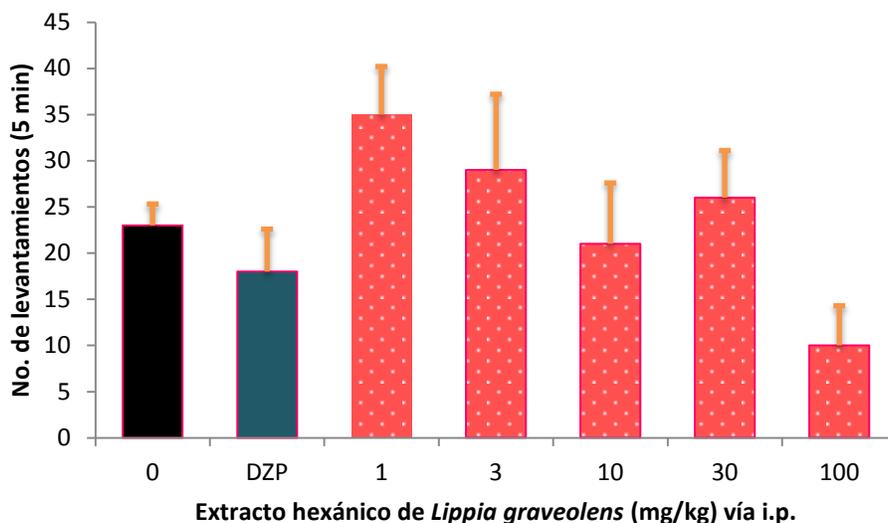


Fig. 19 Evaluación de la actividad ansiolítica y /o sedante del extracto hexánico de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de cilindro. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales.

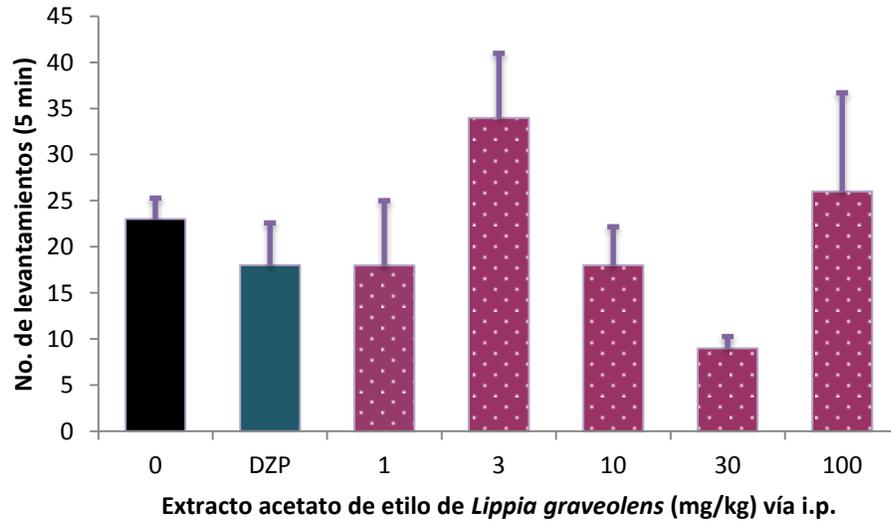


Fig. 20 Evaluación de la actividad ansiolítica y /o sedante del extracto acetato de etilo de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de cilindro. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales.

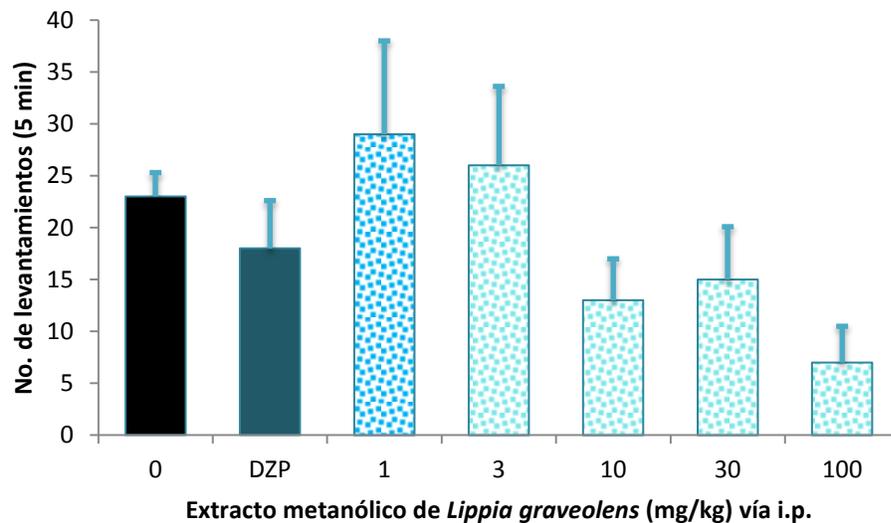


Fig. 21 Evaluación de la actividad ansiolítica y /o sedante del extracto metanólico de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de cilindro. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales.

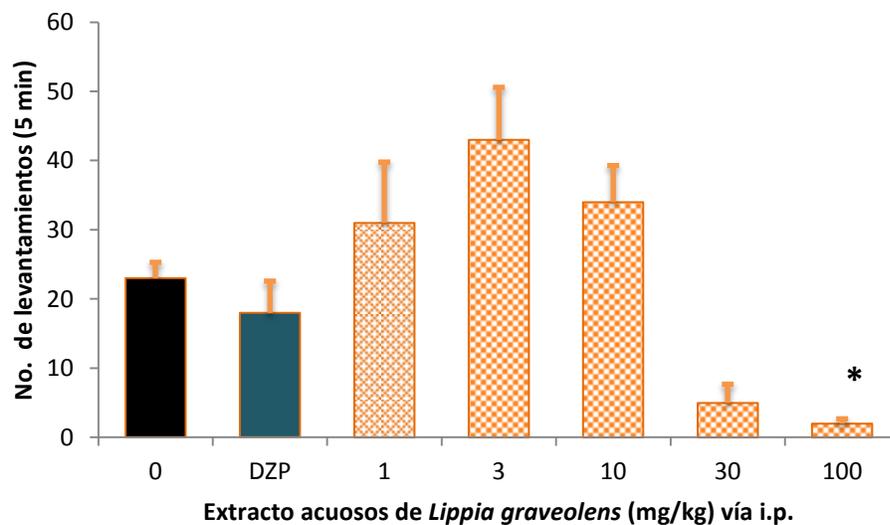


Fig. 22 Evaluación de la actividad ansiolítica y/o sedante del extracto acuoso de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de cilindro. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales. * $P < 0.05$, ANDEVA seguida de la prueba de Dunnett.

3. Brazos abiertos.

Durante esta prueba se tomó el tiempo en que el ratón permanece en los brazos abiertos obteniendo un aumento significativo en el tiempo de permanencia con la administración de todos los extractos, excepto en la dosis de 100 mg/kg del extracto acuoso (Fig. 23-26).

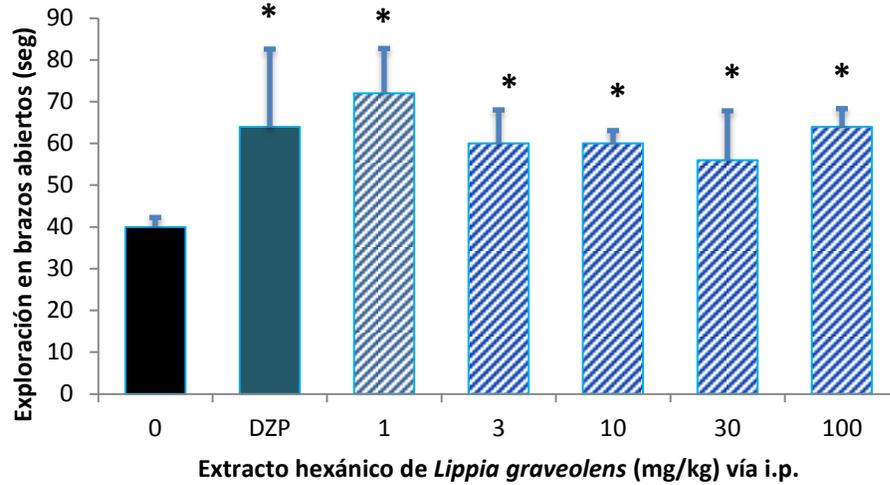


Fig. 23 Evaluación de la actividad ansiolítica y /o sedante del extracto hexánico de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de brazos abiertos. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales. *P<0.05, ANDEVA seguida de la prueba de Dunnett.

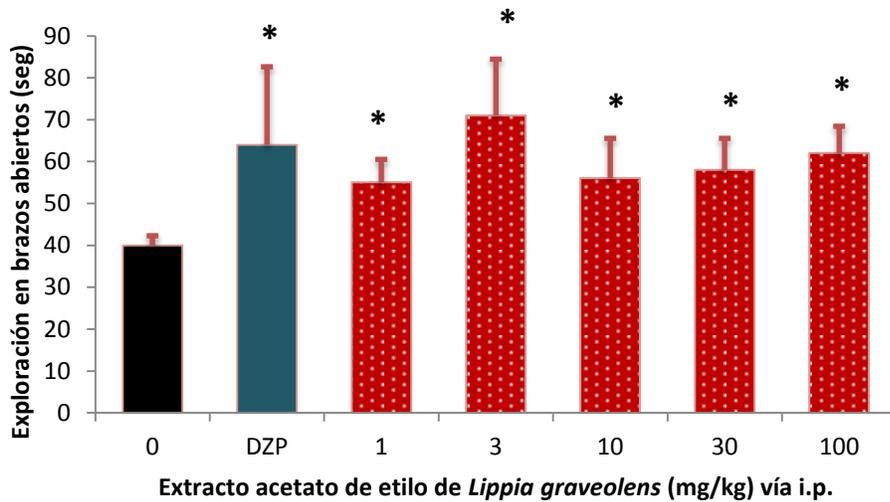


Fig. 24 Evaluación de la actividad ansiolítica y /o sedante del extracto acetato de etilo de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de brazos abiertos. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales. *P<0.05, ANDEVA seguida de la prueba de Dunnett.

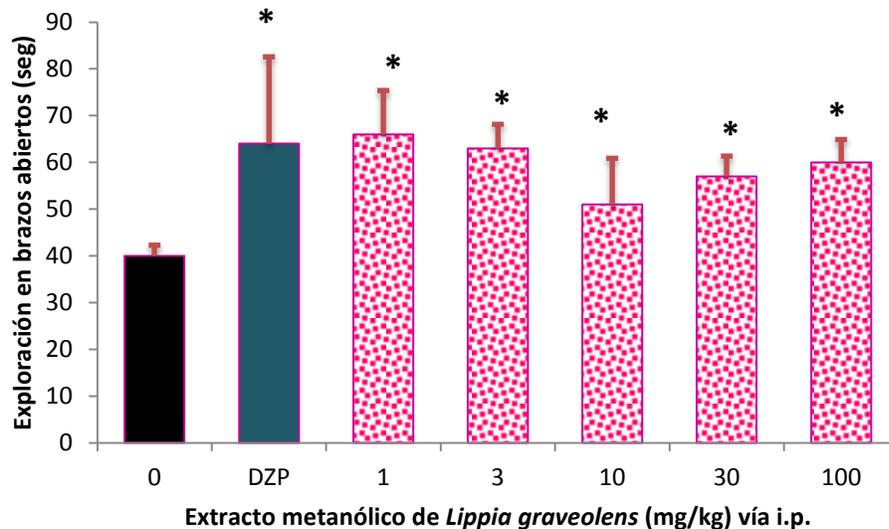


Fig. 25 Evaluación de la actividad ansiolítica y/o sedante del extracto metanólico de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de brazos abiertos. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales. * $P < 0.05$, ANDEVA seguida de la prueba de Dunnett.

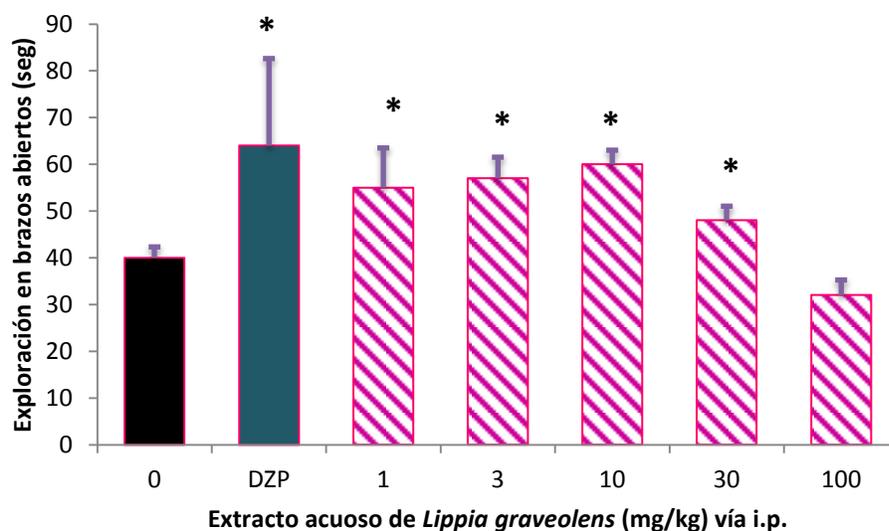


Fig. 26 Evaluación de la actividad ansiolítica y/o sedante del extracto acuoso de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de brazos abiertos. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales. * $P < 0.05$, ANDEVA seguida de la prueba de Dunnett.

6.2.3 Potenciación a la hipnosis inducida por pentobarbital sódico.

En la prueba de potenciación de la hipnosis se mide el tiempo en que el ratón tarda en presentar la sedación, el sueño inducido (hipnosis) y la duración de éste último. La disminución en la latencia a la sedación e hipnosis y un incremento de la duración del sueño nos indica que el extracto produce interacción depresora con el sedante-hipnótico conocido (pentobarbital sódico). Los extractos de hexano y acetato de etilo en las dosis de 30 y 100 mg/kg aumentaron significativamente la duración de la hipnosis, mientras que la latencia a la sedación e hipnosis no se modificó. Estos resultados fueron similares a los producidos por el fármaco de referencia (Fig. 27-28).

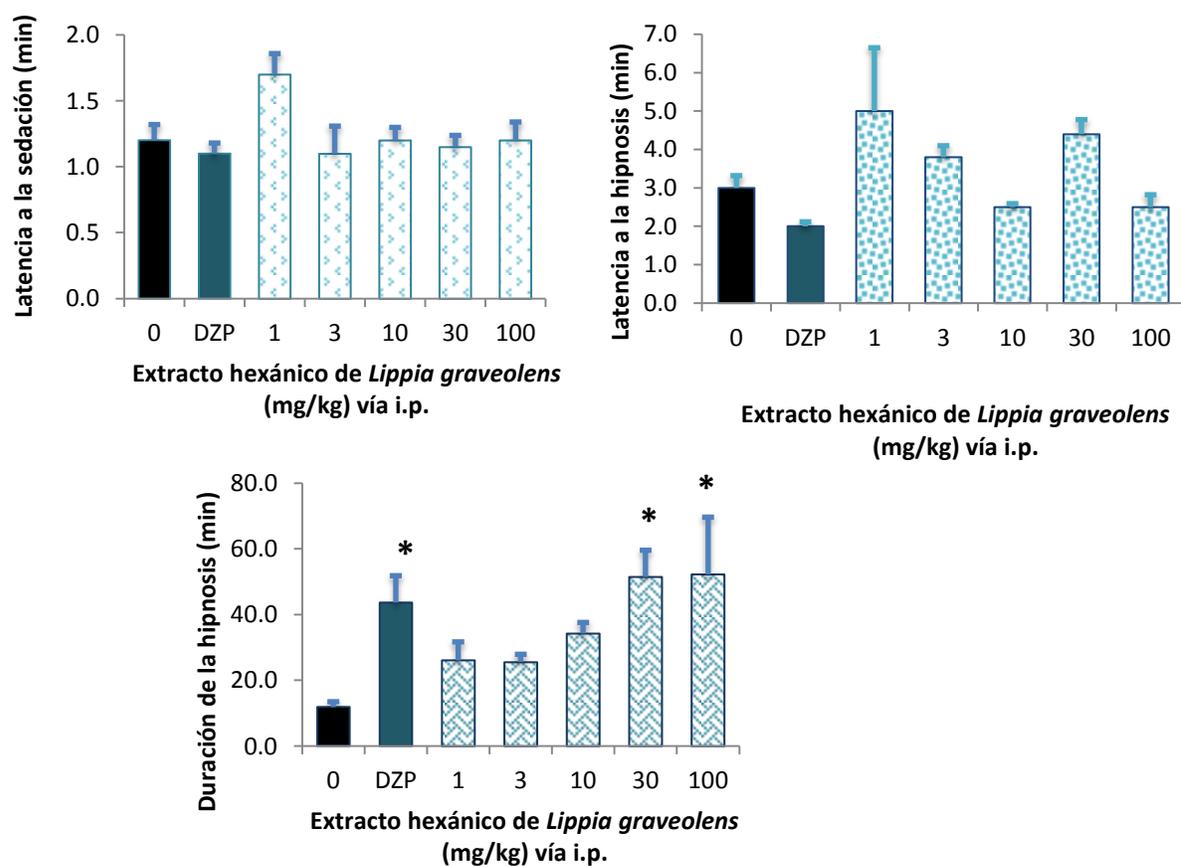


Fig. 27 Modelo de potenciación a la hipnosis inducida por pentobarbital sódico del extracto de hexano de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control, respectivamente. El gráfico muestra datos de latencia a la sedación, latencia a la hipnosis y duración de la hipnosis. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales. * $P < 0.05$, ANDEVA seguida de la prueba de Dunnett.

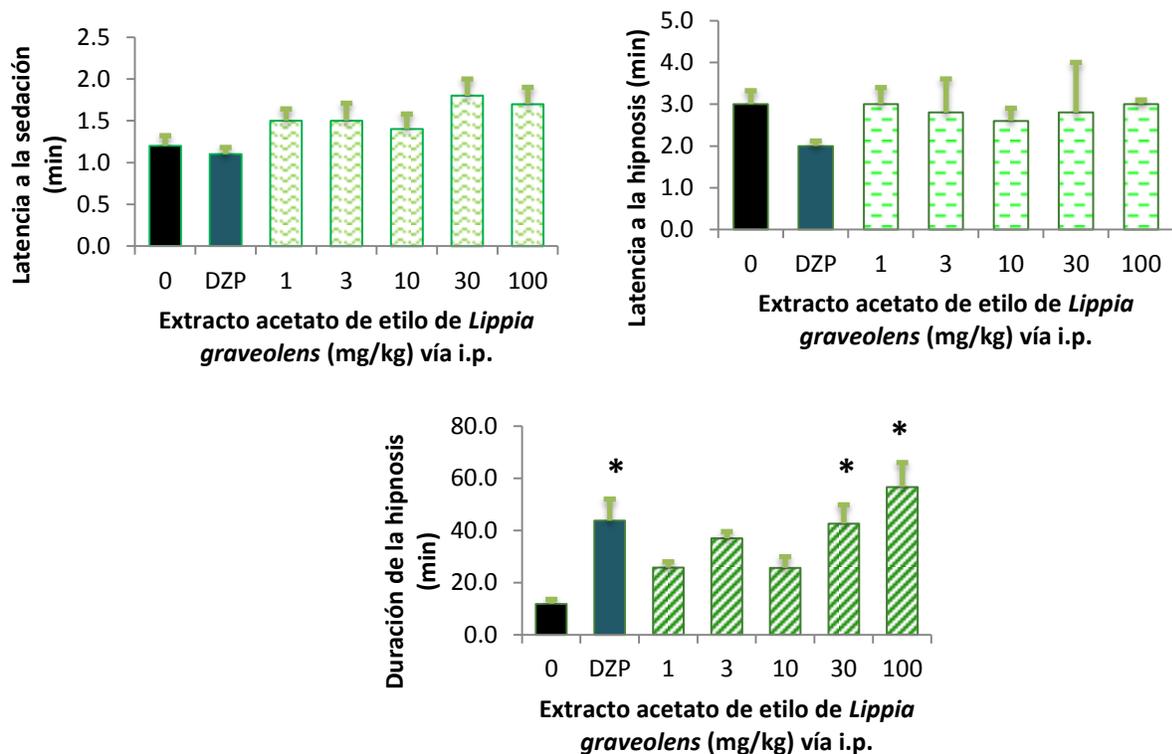


Fig. 28 Modelo de potenciación a la hipnosis inducida por pentobarbital sódico del extracto de acetato de etilo de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control, respectivamente. El gráfico muestra datos de latencia a la sedación, latencia a la hipnosis y duración de la hipnosis. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales. * $P < 0.05$, ANDEVA seguida de la prueba de Dunnett.

Respecto al extracto metanólico se observó que se produce un aumento significativo en la duración de la hipnosis desde la dosis de 3 mg/kg y se mantiene hasta la dosis de 100 mg/kg, similar a lo observado con DZP 0.1 mg/kg. No se modificó la latencia a la sedación o a la hipnosis (Fig. 29).

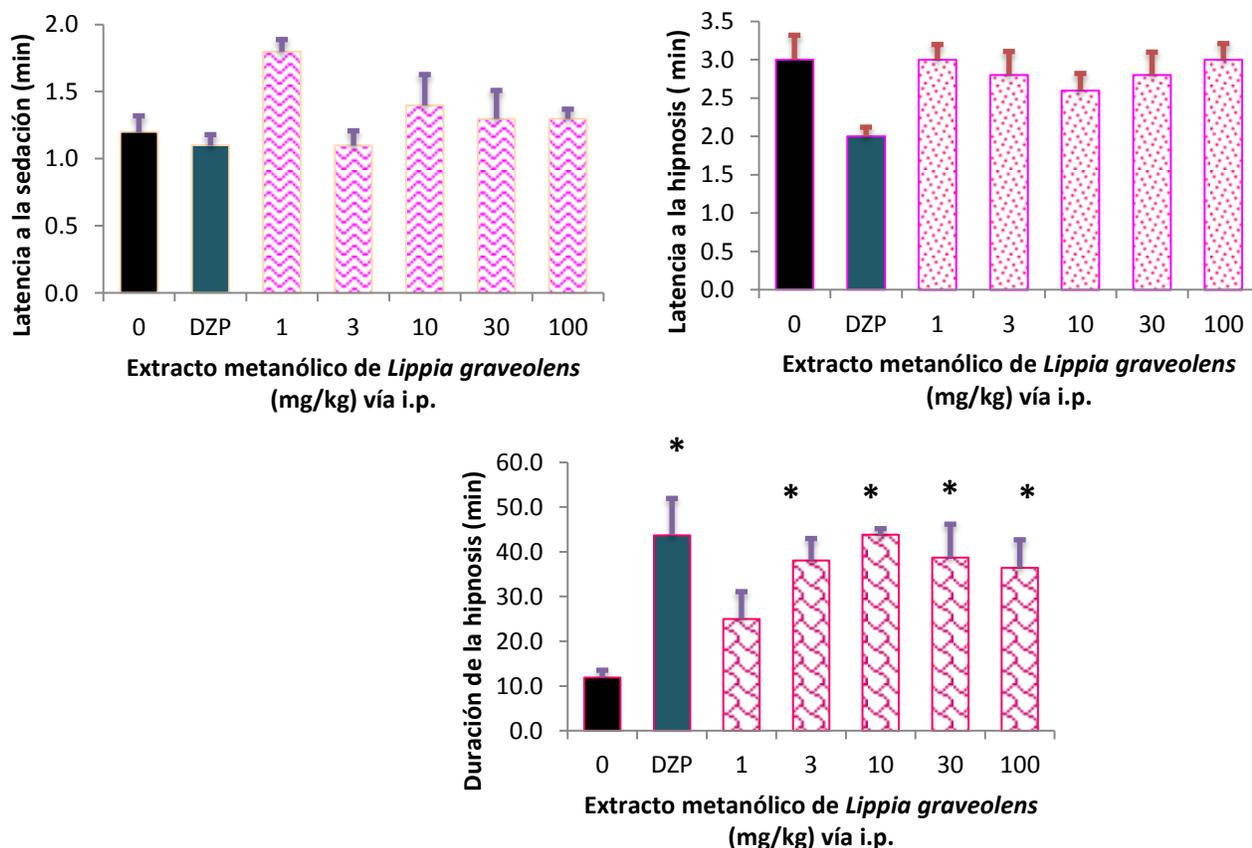


Fig. 29 Modelo de potenciación a la hipnosis inducida por pentobarbital sódico del extracto metanólico de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control, respectivamente. El gráfico muestra datos de latencia a la sedación, latencia a la hipnosis y duración de la hipnosis. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales. * $P < 0.05$, ANDEVA seguida de la prueba de Dunnett.

Finalmente, el extracto acuoso potencio la duración de la hipnosis significativamente a partir de la dosis de 1 mg/kg, dicho efecto se prolongó de manera dosis-dependiente hasta presentar el efecto producido por DZP 0.1 mg/kg, sin cambios en la latencia a la sedación o a la hipnosis (Fig. 30).

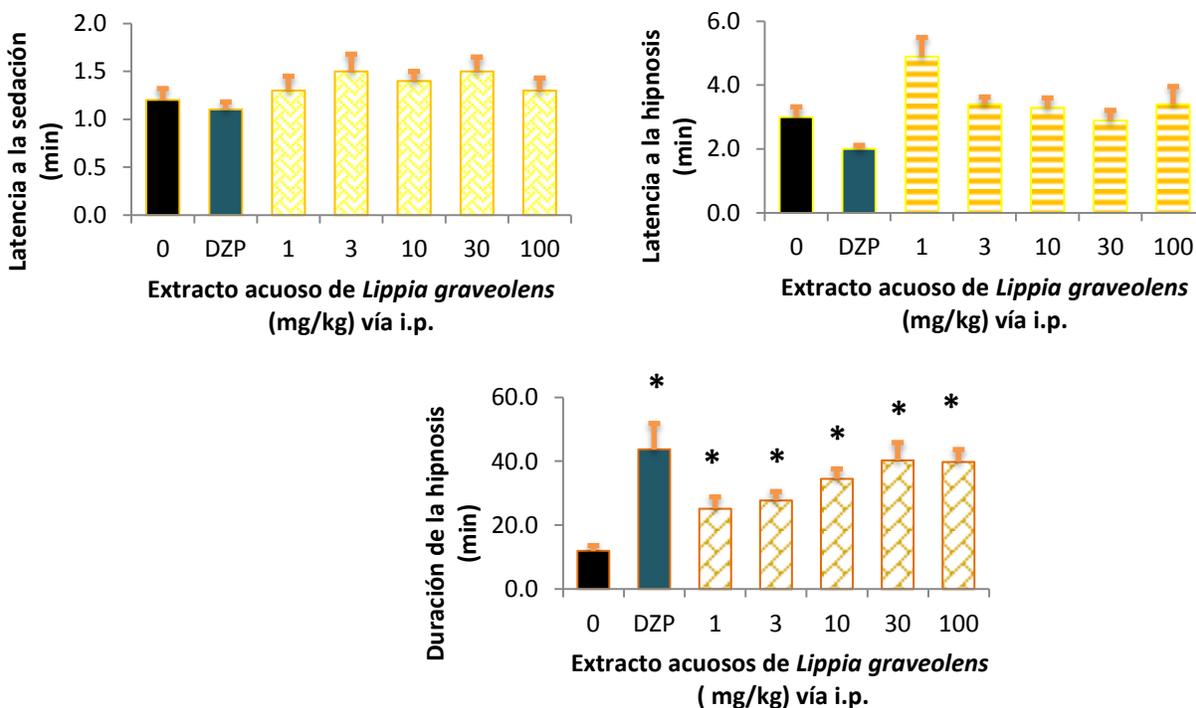


Fig. 30 Modelo de potenciación a la hipnosis inducida por pentobarbital sódico del extracto acuoso de *L. graveolens* (1, 3, 10, 30, 100 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control, respectivamente. El gráfico muestra datos de latencia a la sedación, latencia a la hipnosis y duración de la hipnosis. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales. * $P < 0.05$, ANDEVA seguida de la prueba de Dunnett.

6.2.3 Dosis letal 50.

La toxicidad aguda varió según el extracto de prueba. Para el extracto hexánico se produjo mortalidad aproximadamente en los primeros 30 min de la administración, donde la DL_{50} estimada fue de 1000 mg/kg. Para los extractos metanólico, acetato de etilo y acuoso se produjo mortalidad del 33.3%, por lo que su DL_{50} se estima >2000 mg/kg. Se observó pérdida de peso no significativa en los ratones administrados con extracto acuoso sin la presencia de efectos tóxicos tales como: pérdida de la locomoción, paro respiratorio o muerte. Después de los 14 días de observación los ratones fueron sacrificados y evaluados macroscópicamente y ninguno de los extractos produjo cambios en los tejidos.

6.3 Análisis fitoquímico.

6.3.1 Obtención y análisis de los compuestos puros obtenidos de los extractos crudos de acetato de etilo y metanol de *Lippia graveolens*.

En cuanto al extracto de acetato de etilo la Fig. 31 muestra el diagrama del fraccionamiento donde se obtuvieron 207 fracciones, de las cuales se aislaron cuatro compuestos a los que se les realizaron espectros de RMN-¹H y ¹³C y EM (Anexo). De acuerdo a estos datos, y a los ya reportados en la literatura, dichos compuestos fueron caracterizados como la mezcla de un aceite esencial (p-cimeno + timol) y dos flavonoides (cirsimaritina y naringenina). Los datos se resumen en el Cuadro 9.

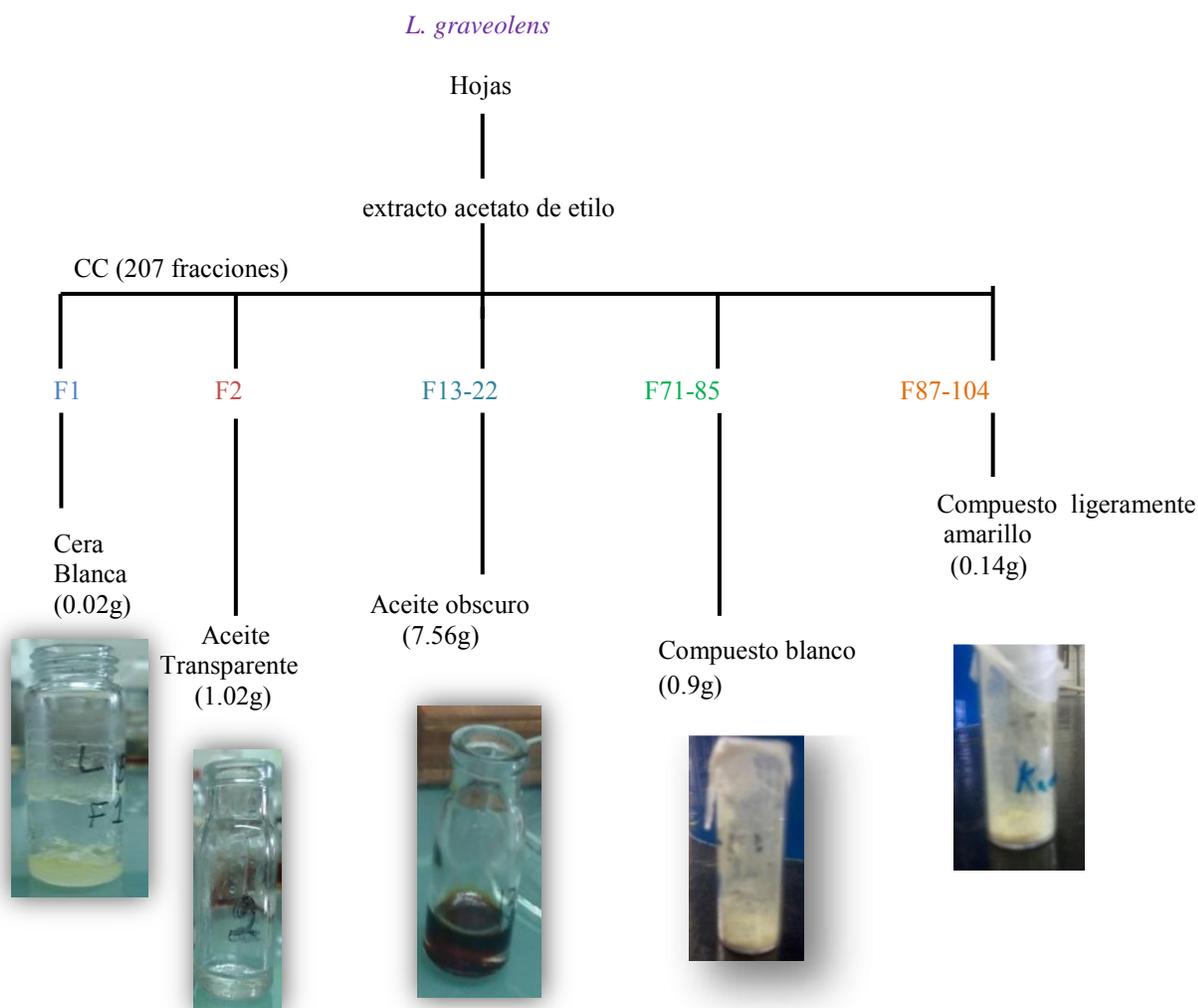
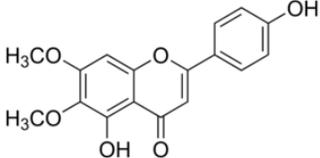
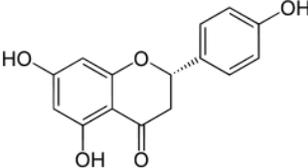
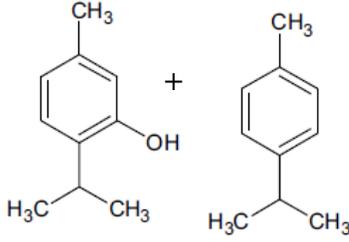


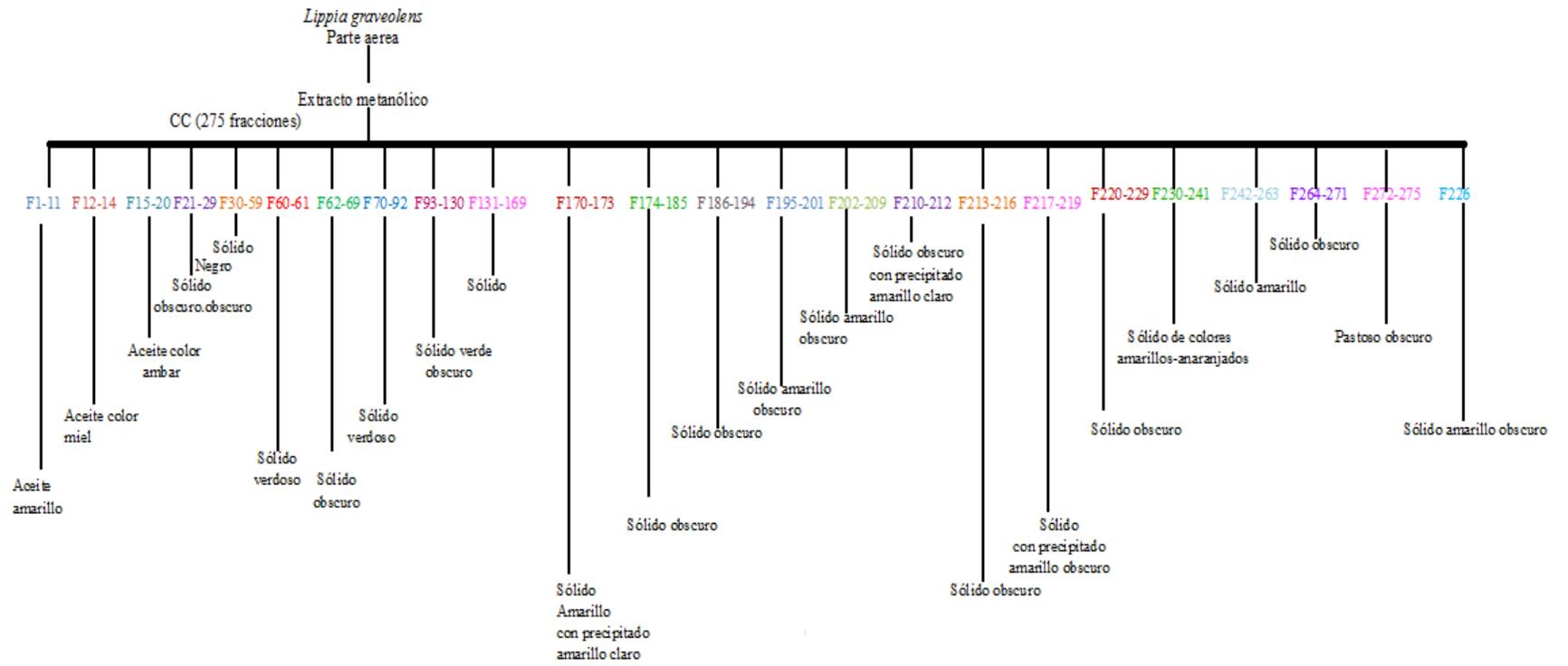
Fig. 31 Esquema de los compuestos obtenidos mediante cromatografía en columna del extracto de acetato de etilo de *L. graveolens*

Cuadro 9. Compuestos puros caracterizados en el extracto de acetato de etilo.

Compuesto	Fracción	Aspecto	Cantidad	Punto de fusión
Cirsimaritina 	87-104	Polvo amarillo	0.14 g	244°
Naringenina 	71-85	Polvo blanco	0.9 g	258°
Mezcla de Timol + p-cimeno 	13-22	Aceite oscuro	7.56 g	

Respecto al extracto de metanol, el fraccionamiento para la obtención de compuestos puros se muestra en la Fig. 32, donde se obtuvieron 275 fracciones de las cuales todas fueron complejas impidiendo la separación de un solo compuesto.

Fig. 32 Fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico de *L. graveolens*.



6.3.2 Análisis por CLAR del extracto acuoso.

Para la identificación de los flavonoides presente en el extracto acuoso de *L. graveolens* se realizó un análisis de CLAR donde el resultado fue la presencia de rutina, apigenina-7-O glucósido, quercetina y galangina detectados de acuerdo a su respectivo tiempo de retención 3.80, 6.07, 9.16 y 21.056 como se muestra en el cromatograma (Fig. 33)

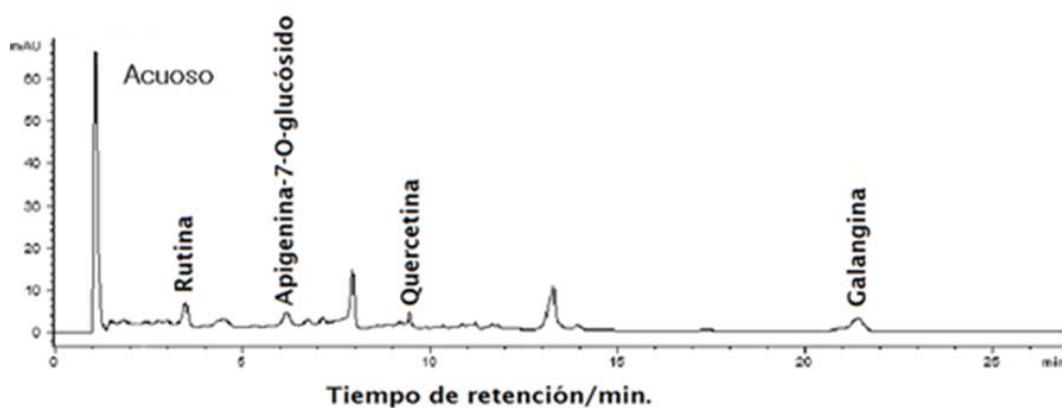


Fig. 33 Análisis por CLAR de flavonoides del extracto acuoso de *L. graveolens*

Una vez caracterizada la estructura de los compuestos obtenidos se procedió a la evaluación farmacológica para identificar si alguno de estos es responsable de la actividad ansiolítica del extracto de acetato de etilo.

6.4 Evaluación farmacológica de los compuestos puros obtenidos del extracto de acetato de etilo de *L. graveolens*.

6.4.1 Actividad ambuladora.

De acuerdo a los resultados obtenidos para esta prueba, ninguno de los compuestos obtenidos presento una disminución o aumento en la actividad ambuladora, todos permaneciendo con una actividad similar al control y DZP (Fig. 34).

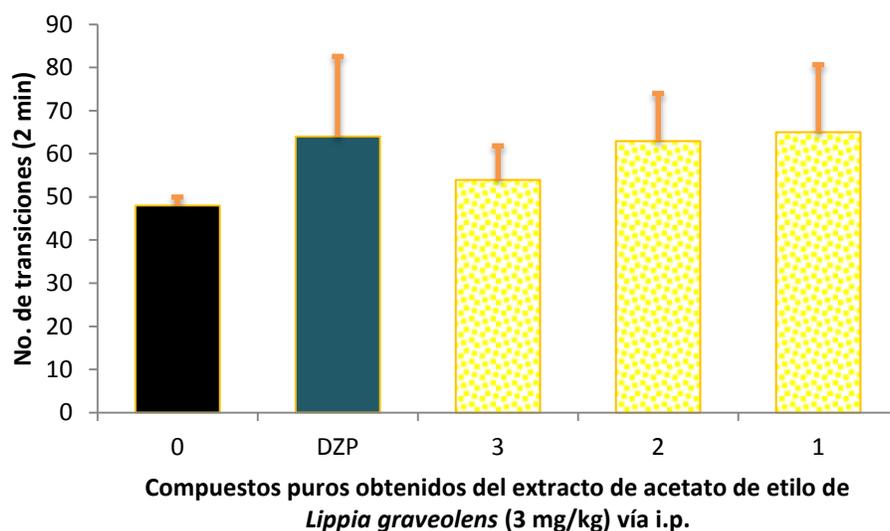


Fig. 34 Evaluación de la actividad ambulatoria de los compuestos puros obtenidos del extracto de acetato de etilo de *L. graveolens* (3= p-cimeno + timol; 2= naringenina y 1= circimaritina 3 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de campo abierto. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales.

6.4.2 Evaluación de la actividad ansiolítico-sedante de los compuestos puros de *L. graveolens*.

1. Modelo tablero con orificios.

En esta prueba, los resultados muestran que hubo una disminución significativa en el número de exploraciones realizadas en cada uno de los compuestos evaluados, lo que nos refiere actividad ansiolítica para estos compuestos (Fig. 35)

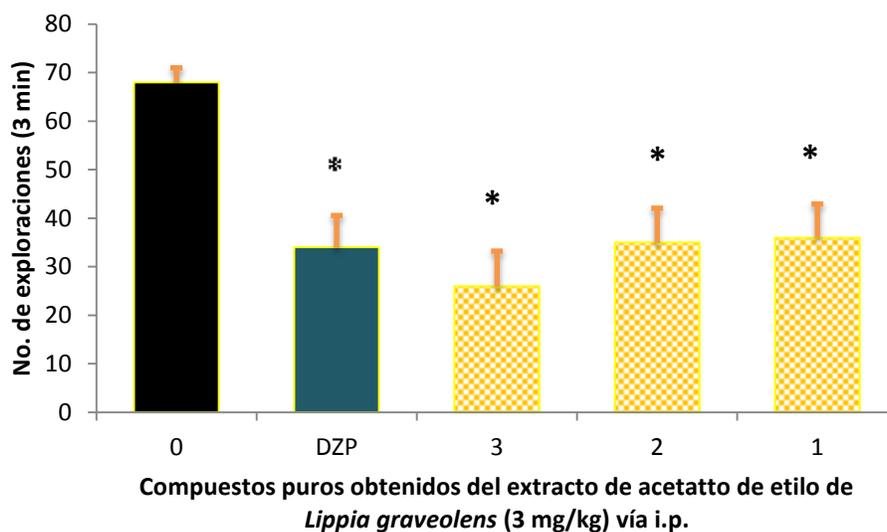


Fig. 35 Evaluación de la actividad ambulatoria de los compuestos puros obtenidos del extracto de acetato de etilo de *L. graveolens* (3= *p*-cimeno + timol; 2= naringenina y 1= circimaritina 3 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo tablero con orificios. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales. * $P < 0.05$, ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett.

Modelo cilindro.

En esta prueba ninguno de los compuestos presento una disminución significativa en el número de levantamientos lo que corrobora que no se induce efecto sedante (Fig. 36)

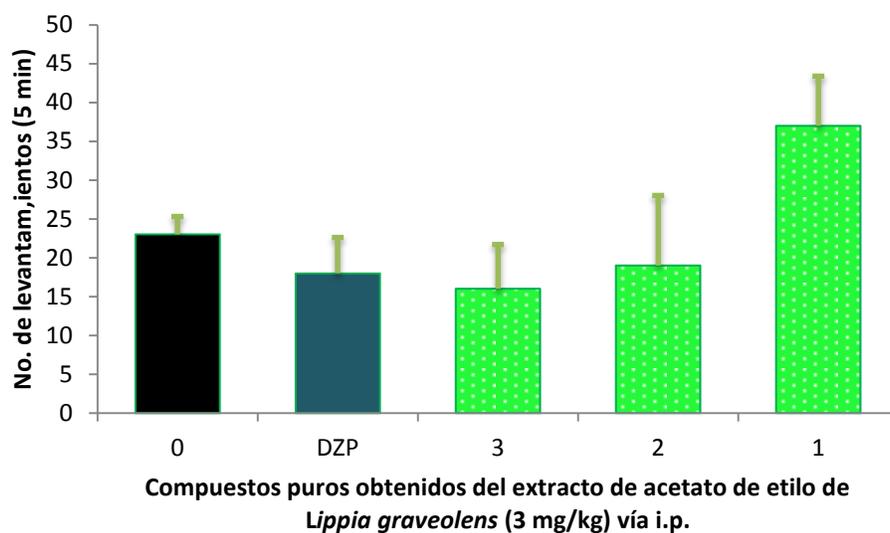


Fig. 36 Evaluación de la actividad ambulatoria de los compuestos puros obtenidos del extracto de acetato de etilo de *L. graveolens* (3= p-cimeno + timol; 2= naringenina y 1= circimaritina 3 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de cilindro. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales.

Modelo Brazos abiertos.

En cuanto a este modelo, todos los compuestos evaluados produjeron un aumento significativo en el tiempo de permanencia en brazos abiertos con respecto al control y similar al de DZP, lo cual nos indica su efecto tipo ansiolítico (Fig. 37)

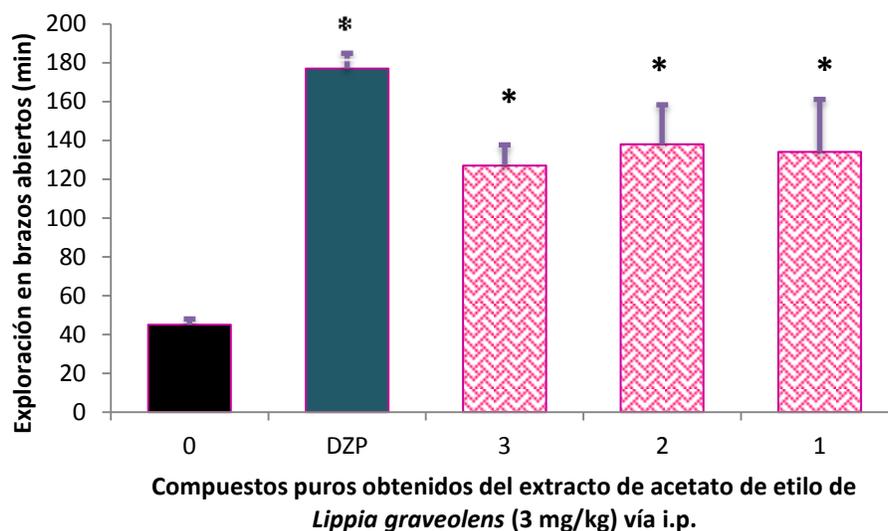


Fig. 37 Evaluación de la actividad ambulatoria de los compuestos puros obtenidos del extracto de acetato de etilo de *L. graveolens* (3= ρ -cimeno + timol; 2= naringenina y 1= circimaritina 3 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos del modelo de brazos abiertos. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales. *P<0.05, ANADEVVA seguida de la prueba de Dunnett.

6.4.3 Potenciación de la hipnosis inducida con pentobarbital sódico de los compuestos aislados de extracto de acetato de etilo de *L. graveolens*.

Respecto a la potenciación de la hipnosis se observa que sólo la mezcla de ρ -cimeno + timol potencio la duración de la hipnosis en forma similar al DZP, (Fig. 38)

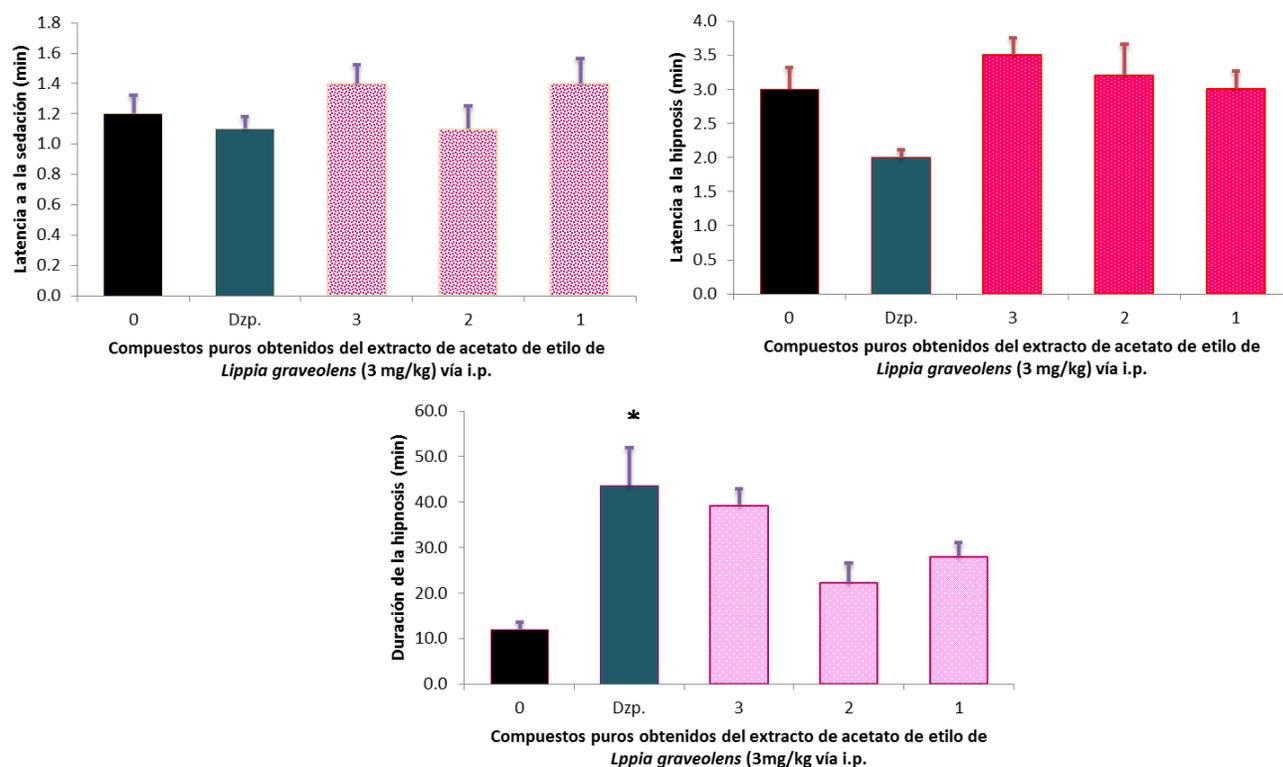


Fig. 38 Modelo de potenciación a la hipnosis inducida por pentobarbital sódico de los compuestos puros obtenidos del extracto de acetato de etilo de *L. graveolens* (3= ρ -cimeno+timol, 2 = naringenina, 1= cirsimaritina 3 mg/kg) y DZP (0.1 mg/kg) vía i.p. en comparación con un grupo control. El gráfico muestra datos de latencia a la sedación, a la hipnosis y duración de la hipnosis. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de seis animales. *P<0.05, ANADEVa seguida de la prueba de Dunnett.

7 **Discusión.**

En México se cuenta con una vasta herencia prehispánica sobre el uso de hierbas medicinales mostrando un amplio cúmulo de especies vegetales cuya acción terapéutica ha sido utilizada durante siglos para tratar diversos padecimientos, y es por eso que la herbolaria mexicana representa un recurso viable para encontrar nuevos tratamientos contra las diferentes enfermedades que aquejan a la población. El saber de la Medicina Tradicional se ha conservado convirtiéndose en un legado de conocimientos antiguos que subsiste como una alternativa de salud para los individuos indígenas y mestizos integrantes de diversos sectores de la sociedad mexicana en distintos Estados, pues es de bajo costo y fácil acceso. Así como también es el caso de los habitantes de los suburbios de las grandes ciudades, quienes utilizan la Medicina Tradicional como un recurso importante de atención para la salud. Sin embargo, el fomento en la utilización de principios activos de origen vegetal puede tornarse peligroso para el paciente, toda vez que se carezcan de estudios químicos, toxicológicos y farmacológicos que garanticen la seguridad y eficacia de una determinada especie a la que popularmente se le atribuyen ciertas propiedades medicinales.

En el presente estudio, se describe la evaluación de las propiedades como ansiolítico y/o sedante que se le atribuyen popularmente en la medicina tradicional, así como la caracterización fitoquímica de extractos acuoso y orgánicos de *L. graveolens*.

De los extractos evaluados en dosis de 1, 3, 10, 30 y 100 mg/kg, vía i.p., se obtuvo que solo el extracto acuoso en la dosis de 100 mg/kg produce disminución en la actividad ambuladora o de exploración de los ratones en el modelo de campo y el cilindro, respectivamente. El fármaco de referencia DZP (0.1 mg/kg, i.p.) tampoco modificó la actividad ambuladora de los ratones, lo que coincide con lo demostrado por Kamei et al. (2001) quien describe que DZP en dosis de 0,1 – 0.56 mg/kg administrado por esta misma vía no modifica la actividad en la prueba. Además, de que está clasificado como un fármaco ansiolítico, anticonvulsivo y relajante muscular, pero no sedante-hipnótico. La evaluación de la actividad ambuladora de los ratones en el modelo de campo abierto es útil para diferenciar entre el efecto ansiolítico y/o sedante producido por una sustancia en asociación con la disminución de las conductas en otros modelos con los cuales se suele establecer el perfil neurofarmacológico. La prueba del cilindro se asocia con efectos

tranquilizantes con tendencia a la inducción a respuesta de sedación en los ratones. Cabe mencionar que debido a que las respuestas evaluadas en estos modelos son de aumento o disminución de la conducta exploradora, es esencial definir la capacidad de un sujeto experimental para desarrollar dicha conducta de exploración para evitar falsos positivos o negativos en la descripción de resultados.

En contraste con los modelos antes mencionados, una sustancia con propiedades ansiolíticas aumenta el tiempo de exploración en brazos abiertos en el modelo de cruz elevada (Handley & Mc Blane, 1993; Rodgers et al., 1997). En esta prueba todos los grupos tratados con los extractos y en cada una de las diferentes dosis produjeron aumento significativos respecto al control desde la dosis de 1 mg/kg, esto corrobora las propiedades ansiolíticas de *L. graveolens* y sugiere que componentes de diferente naturaleza química están involucrados. El efecto ansiolítico se corrobora con la respuesta significativa obtenida con el DZP, ya que trabajos previos han demostrado que su administración aumenta el tiempo de exploración en brazos abiertos (Ariza et al., 2006; Ariza et al., 2007). El efecto tipo ansiolítico de los extractos se refuerza con la respuesta observada en el modelo de tablero con orificios, el cual ha sido reportado para establecer dicha actividad (Redolat et al., 2005). Los resultados de las pruebas de cruz elevada y tablero con orificios demuestran que *L. graveolens* produce efectos tipo ansiolítico desde dosis bajas corroborando el uso que se le atribuye popularmente en la medicina tradicional.

Finalmente, el modelo de hipnosis inducida con pentobarbital sódico (42 mg/kg, i.p.) tiene la finalidad de corroborar el efecto depresor de una sustancia de prueba y de establecer si produce sinergismo de potenciación del efecto con dicho sedante-hipnótico (González-Trujano et al., 1998). Los resultados demuestran que los efectos depresores de los extractos potencian el efecto de pentobarbital sódico, posiblemente por un mecanismo diferente al de éste fármaco. Donde no sólo componentes de diferente naturaleza se involucran como posibles responsables de la actividad ansiolítica de *L. graveolens*, sino que además los de los extractos polares al parecer son más activos. Esto se ha observado con otras especies vegetales con actividad ansiolítica, donde esencialmente los extractos acuosos (Pérez-Ortega et al., 2007) o metanólicos (Aguirre-Hernández, 2008; 2010) se sugiere contienen componentes responsables de dicha actividad; sin embargo como también

se observan efectos ansiolíticos con los extractos de hexano y acetato de etilo no se descarta la participación de compuestos de tipo medianamente polar y no polar, tal es el caso de terpenos como el β -sitosterol reportado en el extracto hexánico de *Tilia* (Aguirre-Hernández, 2009).

Del extracto acuoso existen estudios en los que se han identificado una gran cantidad de compuestos químicos que varían de acuerdo a la variedad de *Lippia* analizada empleando extractos de la misma naturaleza (Valentão et al., 2002; Ricco et al., 2010), siendo los flavonoides los compuestos más abundantes (Rzedowski; Pietta; Dragland et al., 2003). Sin embargo, la composición y cantidad de los metabolitos secundarios de estas plantas dependen de la zona geográfica, factores climáticos, altitud, época de cosecha y su estado de crecimiento (Cimanga et al., 2002; Lecona-Urbe et al., 2003; Salgueiro et al.; Hernández et al., 2009), por lo que en este estudio se realizó un análisis de CLAR con el fin de corroborar la presencia de flavonoides ya reportados en la literatura, tales como glicósidos de quercetina como la rutina de los que ya se ha probado su eficacia como ansiolítico (Aguirre-Hernández et al., 2010). Se sabe que otros compuestos de tipo flavonoide que se encuentran también en los extractos polares o medianamente polares de *L. graveolens* han sido reportados en otras especies medicinales, tal es el caso de crisina y apigenina aisladas de la *Passiflora coerulea* y de *Matricaria rucutita*, respectivamente (Medina et al., 1983); la flavona wogonina aislada de *Scutellaria baicalensis* (Zheng et al., 2002), canferol y quercetina detectados en *Tilia americana* var mexicana (Pérez- Ortega et al., 2008). De los compuestos que se aislaron en este estudio mediante el fraccionamiento de la columna del extracto de acetato de etilo fueron la cirsimaritina, la cual ha sido documentada en *L. citriodora* Kunth por Skaltza y Shamma (1988) y reportada en *L. graveolens* Kunth var. *berlandieri* Schauer por González et al., 2007, quienes le atribuyen propiedades antioxidantes al encontrarse como compuesto mayoritario en el extracto de acetato de etilo. En el presente estudio se da evidencia de su actividad como ansiolítico al obtener resultados significativos en las pruebas de tablero con orificios y brazos abiertos, sin cambios significativos con respecto al control en las pruebas de campo abierto y cilindro, de la misma manera no presentó cambios significativos en las pruebas con pentobarbital, lo cual sugiere que este compuesto actúa como ansiolítico pero no como

sedante y sus efectos podrían involucrar el mismo mecanismo del pentobarbital, por tanto no se observa sinergismo.

La naringenina ha sido reportada como antioxidante extraído del pomelo que podría actuar a nivel hepático normalizando los lípidos en cuadros diabéticos y de hipercolesterolemia. Además se demostró su actividad inhibidora del virus de hepatitis C (HCV) (Yarmush et al. 2010). Fernandez et al., (2009) menciona que la aglicona de la naringenina (naringina) produce efecto como ansiolítico después de ser administrada vía intraperitoneal en dosis de 1 y 3 mg/kg y evaluada en el modelo de brazos abiertos. No obstante, Anderson et al., (2012) la reportan como presente en *Mentha aquatica* donde mediante la evaluación de ratas en el modelo de cruz elevada determinan que no produce efectos de tipo ansiolítico pero si disminuye la actividad ambulatoria, lo cual sugiere un efecto sedante sin actividad ansiolítica. Los resultados difieren respecto a estos datos, una diferencia es la dosis administrada en otra especie, ya que en este caso se utilizaron ratones evaluados en las pruebas de brazos abiertos y tablero con orificios, en ambos se mostró efecto ansiolítico pero sin producir cambios en la actividad ambulatoria en las prueba de campo abierto y cilindro, de la misma manera no presentaron cambios en la duración de la hipnosis por lo que se sugiere su actividad como ansiolítico no sedante. En el caso de la mezcla timol + ρ - cimeno, no se tiene referencia de que alguno de ellos produzca efectos como ansiolítico, aunque se ha comprobado que el timol produce efectos inductores sobre la 7-etoxicumarin-O-desetilasa, la glutatión-S-transferasa y la quinina reductasa y como regulador alostérico de receptores GABA_A en humanos (Priestley et al., 2003). Siendo estos receptores el principal sitio de acción para el neurotransmisor ácido- γ -aminobutírico (GABA) el cual funciona como mensajero químico de tipo inhibidor en el SNC. Su existencia en el tejido nervioso garantiza el equilibrio entre excitación e inhibición neuronal, un requisito fundamental en la función sensitiva, cognitiva y motora. De lo anterior, es válido pensar que las alteraciones en la función gabaérgica son el sustrato fisiológico para el desarrollo de diversos trastornos neurológicos y psiquiátricos, como ansiedad, depresión o drogadicción. En este caso nuestros resultados indican que la mezcla de estos dos compuestos posee actividad como ansiolítico no sedante y que podría estar asociado a una actividad GABAérgica de acuerdo con lo sugerido por Priestley et al., (2003) en su propiedad como regulador alostérico del receptor GABA_A. En cuanto a

Cirsimaritina no se ha reportado nada de su posible uso como ansiolítica mientras que en el presente estudio se muestra que la dosis administrada de este compuesto presento también actividad como ansiolítico no sedante.

8 Conclusión.

De acuerdo a los resultados, *L. graveolens* posee actividad como depresor del SNC que en dosis altas se asocia a sedación, donde constituyentes de diferente naturaleza, tales como la naringenina, el canferol y la mezcla de ρ -cimeno + timol actúan como responsables parciales de su actividad ansiolítica. Este estudio da evidencia experimental del potencial de esta especie para la terapéutica de la ansiedad y corrobora su uso como tal en la Medicina Tradicional. No obstante que mediante el cálculo de la DL_{50} se observa cierta seguridad en su uso, estos datos deben tomarse con cautela ya que en la medicina tradicional también se le atribuyen propiedades estrogénicas que podrían causar aborto, de esta información se restringe su consumo en mujeres embarazadas.

9. Bibliografía.

Aguirre, H.E. 2009. Composición química y evaluación del efecto ansiolítico y sedante de *Tilia americana* var. mexicana (Tiliaceae). Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 102 pp.

Antai-Otong, D. 2007. Trastornos de ansiedad. Educación sanitaria del paciente. *Nursing* 25(6):26-27.

Arcila-Lozano, C. C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S. y González de Mejía, E. 2004. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 54(3):100-11.

Ariza, S.Y., Rincón, J. y Guerrero, M.F. 2006. Actividad anticonvulsivante de metabolitos secundarios tipo cumarina. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas* 35(1): 106-119.

Babic, D. 2007. Herbal medicine in the treatment of mental disorders. *Psychiatria Danubina* 19 (3):241-244.

Bahl, J.R., Garg, S.N., Singh, S.C., Bansal, R.P., Naqvi, A.A. y Kumar, S. 2000. "Composition of linalool rich essential oil from *Lippia alba* grown in Indian plains" *Flavour and Fragrance Journal* 15(3): 199-200.

Ballenger, J. 1998. Comorbidity of panic and depression: implications for clinical management. *International Clinical Psychopharmacology* 13(4): S13-S17.

Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. 2002. *Herbal Medicine: A Guide for Health Care Professionals*. 2° Ed. Pharmaceutical Press, London, U.K. 530 p.

Bassole, I. H., Ouattara, A. S., Nebie, R., Ouattara, C. A., Kabore, Z. I. y Traore, S. A. 2003. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry* 62:209-12.

Belló, M. 2005. Prevalencia y diagnóstico de depresión en población adulta en México. *Salud Pública en México* 47(sup. 1): 4-11.

Berenzon, G.S., Alanís, N.S., Saavedra, S.N. 2009. El uso de las terapias alternativas y complementarias en población mexicana con trastornos depresivos y de ansiedad: Resultados de una encuesta en la Ciudad de México. *Salud Mental* 32(2): 107-115.

Bouton, M.E., Mineka, S. y Barlow, D.H. 2001. A modern's learning theory on the etiology of panic disorder. *Psychological Review* 108(1): 4-32.

Burt, S. A. y Reinders, R. D. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* 36:162-7.

Cáceres, A. 1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria. Guatemala. pp. 313-364.

Clark, G., Koster, A. y Person, D.W. 1997. Exploratory behaviour in chronic disulfoton poisoning in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 20(2):169-171.

Coleta, M., Campos, M.G., Cotrim, M.D. y Proença da Cunha, A. 2001. Comparative evaluation of *Melissa officinalis* L., *Tilia europaea* L., *Passiflora edulis* Sims. and *Hypericum perforatum* L. in the elevated plus maze anxiety test. *Pharmacopsychiatry* 4 Suppl 1:S20-1.

Costa, S. M., Lemos, T. L., Pessoa, O., Pessoa, C., Montenegro, R.C. y Braz-Filho, R. 2001 Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. *Journal of Natural Products* 64(6):792-795.

Craker, L. y Simon, J. E. 1992. Herbs, spices and medicinal plants. Recent advances in botany, horticulture and pharmacology. Food Products Press. Vol. 3.pp.103-44.

De las Heras, B., Slowing, K., Benedi, J., Carretero, E., Ortega, T., Toledo, C., Bermejo, P., Iglesias, I., Abad, M.J., Gomez-Serranillos, P., Liso, P.A., Villar, A. y Chiriboga, X. 1998. Antiinflammatory and antioxidant activity of plant used in traditional medicine in Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology* 61, 161–166.

Dominguez, X., Sánchez, H., Suárez, M., Baldas, J. y González M. 1989. Chemical constituents of *Lippia graveolens*. *Plantas Medicinales* 55(3):208-209.

Domínguez, X. A. 1973. "Métodos de investigación fitoquímica". Centro Regional de Ayuda Técnica. Ed. Limusa. México.

Eisenberg, D.M., Kessler, R.C., Foster, C., Norlock, F.E. y Calkins, D.R. 1993. Unconventional medicine in the United States: Prevalence, cost and patterns of use. The New England Journal of Medicine 328(4): 246-252.

García Barriga, H. 1992. Flora medicinal de Colombia. Botánica médica, 2° Ed. Tercer Mundo, Bogotá.

García-Totoriello, J. 2013. Mexicanos contra la ansiedad. Hypatia. 7(1): 9-37.

Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L., Arteaga, L. y San Román, L. 2002. Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 80(1):37-42.

Gupta, M.P. 1995. 270 Plantas medicinales Iberoamericanas. 1° Ed., CYTED-SECAB, Bogotá.

Handley, S. y Mc Blane, J.W. 1993. Opposite effects of fluoxetine in two animal models of anxiety. Brazilian Journal of Pharmacology 107-446

Hernández, T., Canales, M., Ávila, J. G., García, A. M., Meraz, S., Caballero, J. y Lira, R. 2000. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* Kunth.(Verbenaceae). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 8(4):295-300.

Hernández, A.O., Castillo, O., Leon, I., Ibarra, M., Villalobos, R., González, J., Vergara, J. y Estrada, S. 2009. Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. Biochemical Pharmacology 78(1): 54-61.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Joseph, H. y Bailleul, F. 2008. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. Journal of Ethnopharmacology 116(2):211-222.

Hiller, K. y Zetler, G. 1996. Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis*: behavioral and anticonvulsant properties. *Phytotherapy Research* 10(2):145-151.

Huerta, C. 1997. Orégano mexicano: oro vegetal. *Biodiversitas* 15:8-13.

Hutchings, A. y Van Staden, J. 1994. Plants used for stress-related ailments in traditional Zulu, Xhosa and Sotho medicine. Part I: Plants used for headaches. *Journal of Ethnopharmacology*. 43(2): 89-124.

Kamei, J., Matsunawa, Y., Miyata, S., Tanaka, S. y Saitoh, A. 2004. Effects of nociceptin on the exploratory behavior of mice in the hole-board test. *European Journal of Pharmacology* 489(1-2):77-87.

Kaplan, H. y Sadock, B. 2004. *Comprehensive text book of psychiatry*. 8° Ed. Philadelphia: Lippincott Williams y Wilkins. pp. 1594-1603.

Kumar, J.K. y Bhatnagar, S.P. 2006. Risking alternative and complementary medicine in the name of standardization. *Complementary and Alternative Medicine* 12(5): 419-420.

Kumar, V., Jaiswal, A.K., Bhattacharya, S.K. 2000a. Anxiolytic activity of Indian *Hypericum perforatum* Linn in rodents. *Indian Journal of Experimental Biology* 38(1):36-41.

Lister, R.G. 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92(2):180-185.

Long-Ze, L., Robbins, J.R. y Harnly, M.J. 2006. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* 20(5):361-367.

Lorke, D., 1983. A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing, Institut für Toxikologie, Bayer AG. *Archives of Toxicology* 54:275-287.

Martínez, M. A. 2005. Evaluación del perfil neurofarmacológico del extracto etanólico de las hojas de Magnolia de albata en ratones. Tesis de Licenciatura. UNAM. Facultad de Química. México, D.F. 115 pp.

Martínez & Crovetto, R. 1981. Plantas utilizadas en medicina en el Noroeste de Corrientes. Fundación Miguel Lillo. Tucumán, Argentina. 69(1):1-135.

Medina, E., Borges, G., Lara, C., Benjet, C., Blanco, J., Fleiz, C., Villatoro, J., Rojas, E., Zambrano, J. y Casanova, L. 2003. Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: resultados de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. Salud Mental 26(4): 1-16.

Mendoza, C. 1995. Confirmación de la actividad antimicrobiana de tres especies del género *Lippia*. Tesis. Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia pp. 48.

Monroy, C. y Castillo, P. 2000. Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos, Centro de Investigaciones Biológicas. Morelos, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. pp. 321-339.

Nakatani, N. 1992. Natural antioxidants from spices. In: Ho, C., Lee, C. Y., and Huang, M. Phenolic compounds in food and their effects on health II. American Chemical Society. 6: 72-85.

Núñez, M. E. 1982, Plantas medicinales de Costa Rica y su folclore. Universidad de Costa Rica, 318p.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2000. Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional WHO/EDM/TRM 72000.1. Ginebra OMS.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2002. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. WHO/EDM/TRM 2002.1. Ginebra: Programa de medicina tradicional. OMS.

Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez, M. D. y Villar, A. 2001. Lippia: Traditional uses, chemistry and pharmacology. A review Journal of Ethnopharmacology. 76(3):201-14.

Pérez, S.G., Zavala, M.A., Vargas, R., Pérez, C. y Pérez, R.M. 1998. "Antidiarrheal activity of C-9 aldehyde isolated from *Aloysia triphylla*", Phytotherapy Research 12(1): S45-S46.

Pérez, O. G. 2009. Estudio etnobotánico y fitoquímico de *Tilia americana* var. mexicana (Schltdl.) Hardin. En el estado de Michoacán. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. UNAM. Facultad de Ciencias. México, D.F. 89 pp.

Pérez, G. 2002. Compuestos aislados de plantas con actividad antiinflamatoria, antiviral e Hipoglucemiante. México D.F., Instituto Politécnico Nacional.

Pichot, P. 1994. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4° Ed. Washington: American Psychiatric Association. pp. 401-56.

Pietta, P. G. 2000. Flavonoids as Antioxidants. Journal of Natural Products 63(7):1035-42.

Priestley, C.M., Williamson, E.M., Wafford, K.A. y Sattelle, D.B. 2003. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA(A) receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. British Journal Pharmacology 140(8):1363-72.

Ramamoorthy, T.P., Bye, R., Lot, A. y Fa, J. 1998. Diversidad biológica de México: orígenes y distribución. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. pp. 689-713.

Ratera, E. L. y Ratera, M. O. 1980. Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular. Hemisferio Sur, Buenos Aires. 189 p.

Rodgers, R. J., Cao, B. J., Dalvi, A., y Holmes, A. 1997a. Animal models of anxiety: an ethological perspective. Brazilian journal of medical and biological research 30(3): 289-304.

Salgueiro, J.B., Ardenghi, P., Dias, M., Ferreira, M.B., Izquierdo, I. y Medina, J.H. 1997. Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 58(4):887-91.

Salisbury, F.B. 1994. "Fisiología Vegetal" Grupo Editorial Iberoamérica. México.

Sánchez, O., Medellín, R., Aldama, A., Goettsch, B., Soberón, J. y Tambutil, M. 2007. Métodos de Evaluación de Riesgo de Extinción de las especies silvestres en México (MER). Instituto Nacional de Ecología. México. 173 p.

SHAPIRA, Valeria. Enfermedades modernas. Lanacion.com [en línea]. 28 de octubre de 2001. [fecha de consulta: 7/05/2013]. Disponible en: <http://www.lanacion.com.ar/212456-enfermedades-modernas>.

Skaltsa H y Shammass, G. 1988. Flavonoids from *Lippia citriodora*. *Planta Medica* 54(5):465.

Skandamis, P., Tsigarida, E. y Nychas, G-J. E. 2002. The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5° C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiology* 19(1):97-103.

Sollozo-Dupont, I., Estrada, C.E. y López-Rubalcava, C. 2011. Medicina tradicional: Estudios preclínicos de plantas con propiedades ansiolíticas. *El Residente* 6(2): 78-84.

Tortoriello, J. y Romero. O. 1992. Plants Used by Mexican Traditional Medicine with Presumable Sedative Properties: An Ethnobotanical approach. *Archives of Medical Research* 23(3):11-116.

Valentao, P., Fernández, E., Carvalho, F., Branquinho Andrade, P., Seabra, R.M. Y Bastos, M.L. 2002. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusión: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25(10):1324-7.

Vander, A. 1972. Plantas medicinales, las enfermedades y su tratamiento por las plantas. Barcelona, España. Síntesis 253p.

Wagner, H. y Bladt, S. 1996. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer Verlag, Berlin. 384 p

Wagner, K.H. y Elmadfa, I. 2003. Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. *Annals of Nutrition and Metabolism* 47(3-4):95-106.

Zétola, M., De Lima, T.C.M., Sonaglio, D., González- Ortega, G., Limberger, R.P., Petrovick, P.R. Y Bassani, L. 2002. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* – Verbenaceae (Brazilian false melisse). *Journal Ethnopharmacology*. 82(2-3):207-215

Zhang, ZJ. 2004. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sciences* 75(14): 1659-1699.

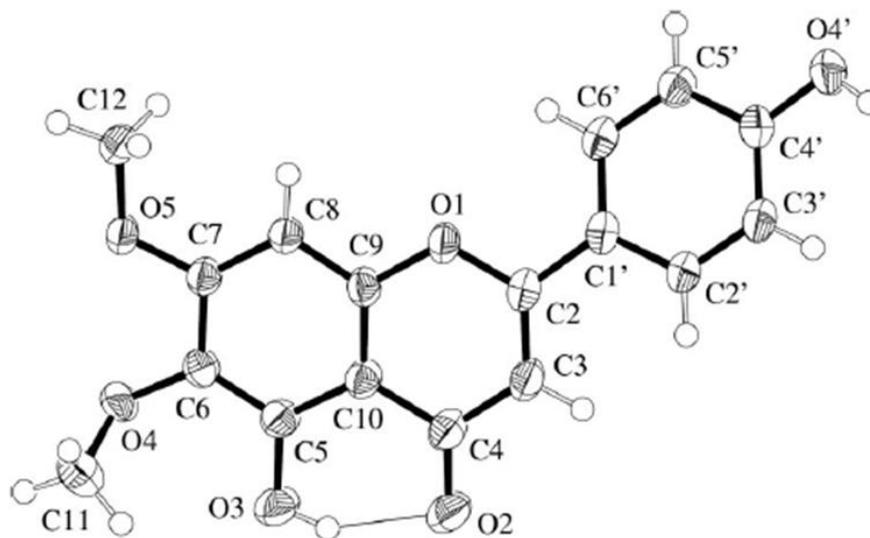
Zhang, J., Yuan, K., Zhou, W., Zhou, J. y Yang, P. 2011. Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of *Mimosa pudica* Linn. from southern China. *Pharmacognosy Magazine*. 7(25):35-39.

ANEXOS

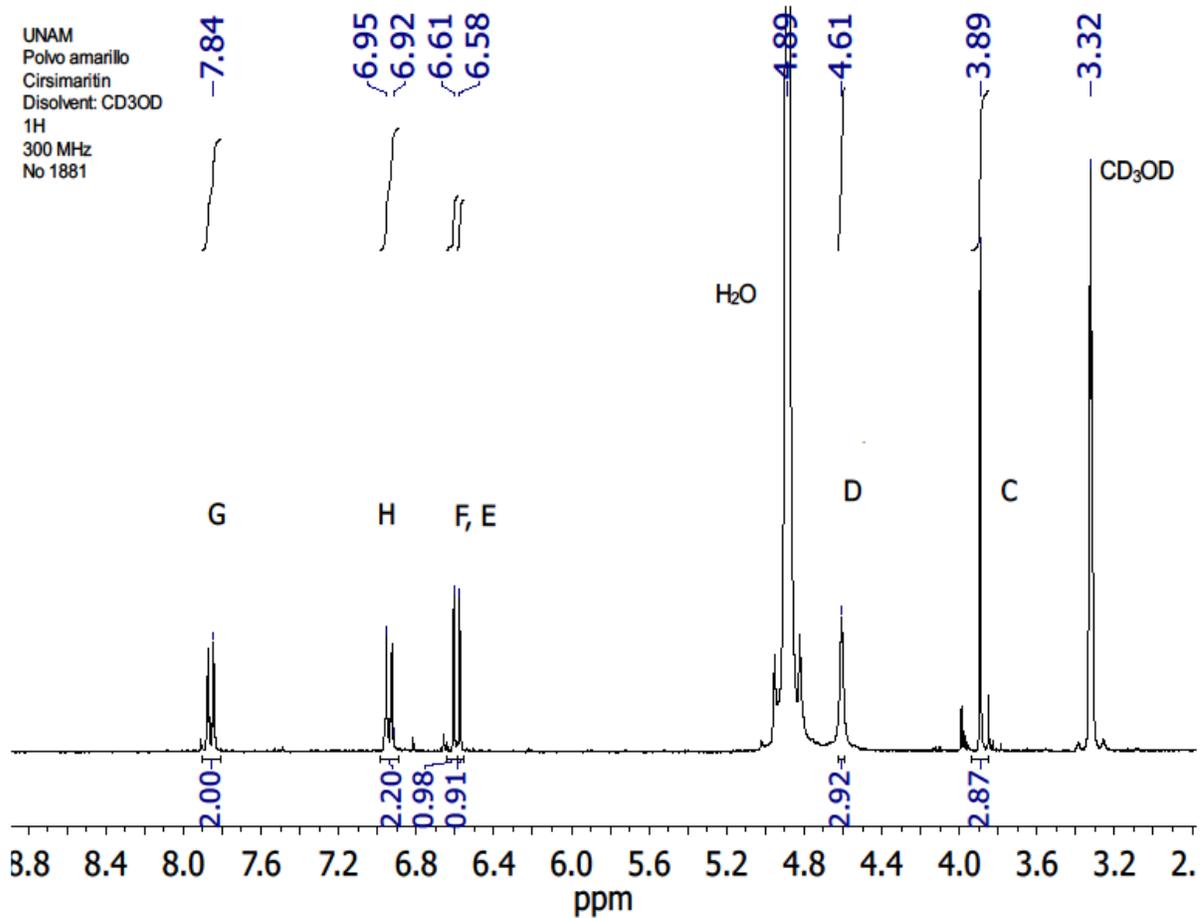
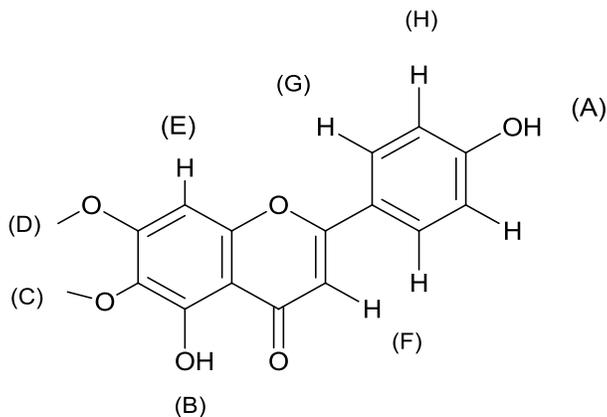
Confirmación química del compuesto Cirsimaritina obtenida de la fracción 87-104 del extracto de acetato de etilo de *Lippia graveolens* por difracción de rayos-X, RMN-¹H, RMN-¹³C y espectro de masas.

Elucidación de Cirsimaritina, el polvo amarillo fue cristalizado en CH₃OH y por evaporación lenta se obtuvieron monocristales adecuados para difracción de rayos-X. La estructura corresponde al compuesto ya reportado, los parámetros de celda del monocristal obtenido y los reportados son iguales.

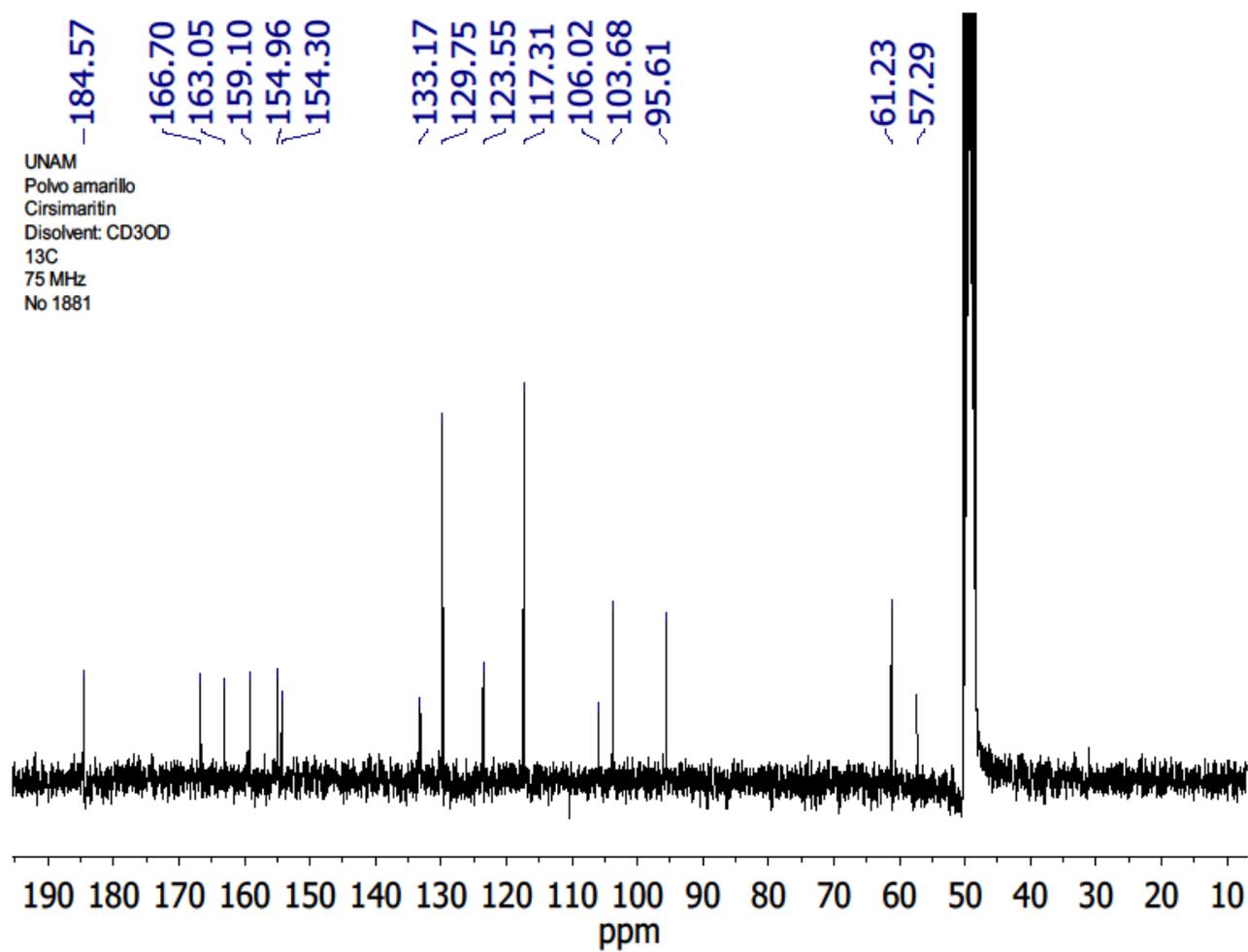
Datos del cristal	Orthorhombic, Pbc ₂
C ₁₇ H ₁₄ O ₆	a = 8.3669 (2) Å
Mr = 314.28	b = 13.5769 (4) Å
	c = 25.2554 Å
	V = 2868.93 (15) Å ³



Espectro RMN^{-1}H del compuesto asignado como Cirsimaritina en CD_3OD . Las señales de $-\text{OH}$ en (A) y (B) se pierden por intercambio de deuterio con el disolvente deuterado.

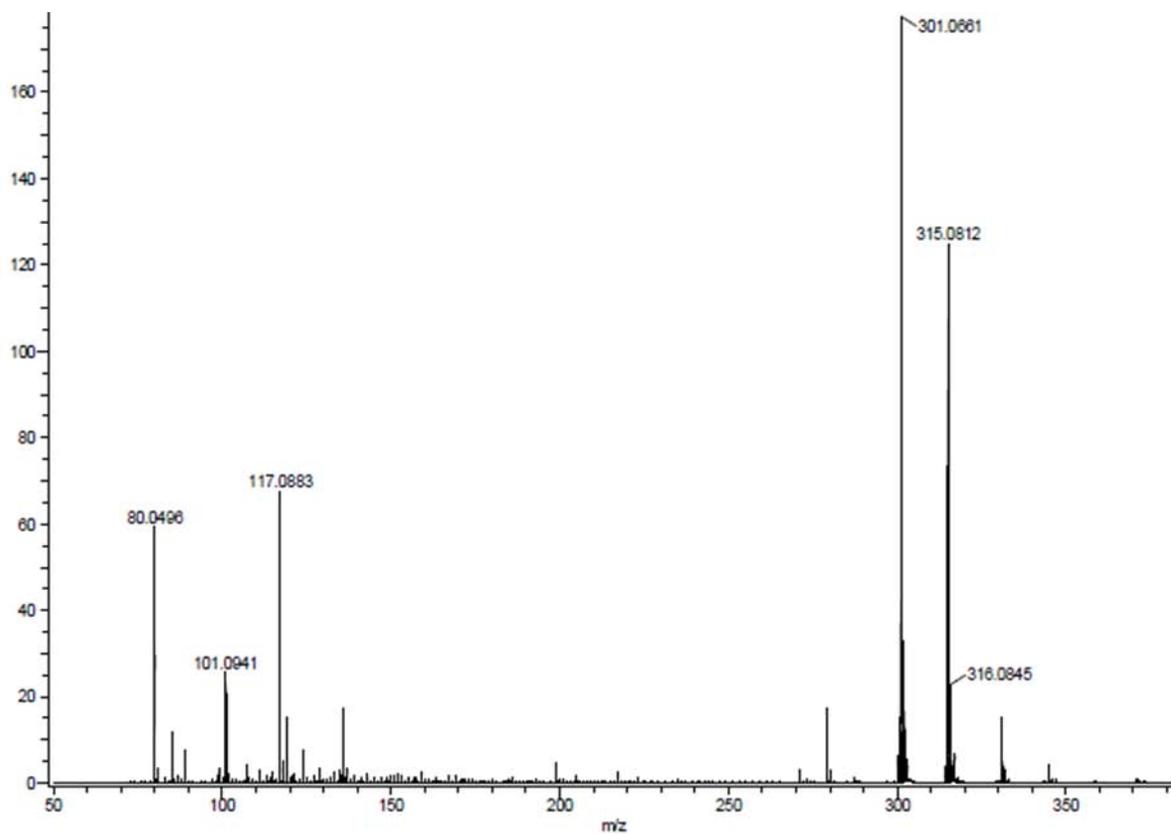


Espectro RMN-¹³C de Cirsimaritina en CD₃OD



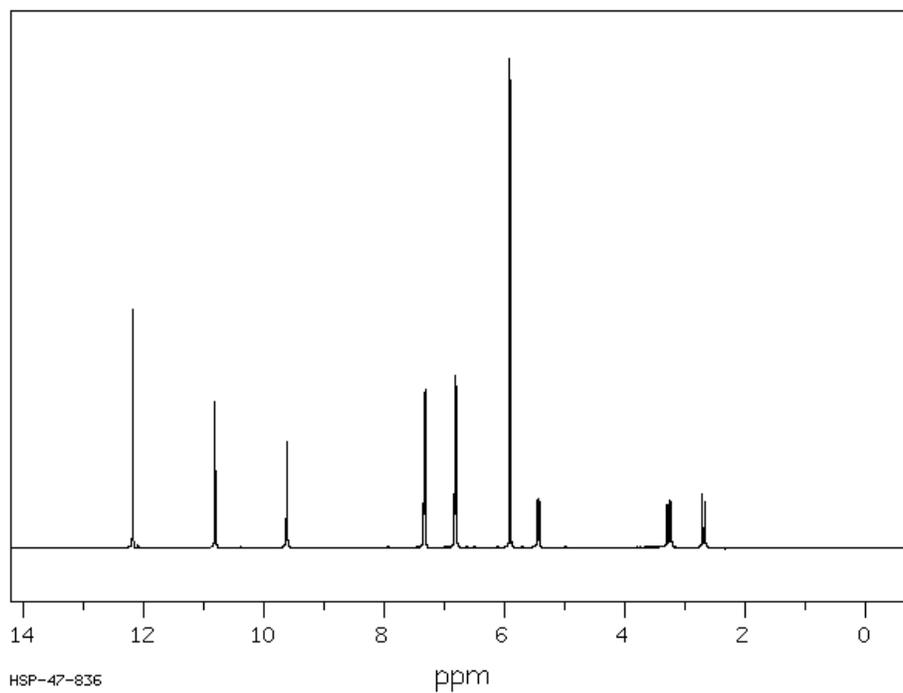
Espectrometría de masas de Circimaritina Espectrómetro de masas Jeol, The AccuTOF JMS-T100LC, método FAB positivo.

Ion molecular de [Circimaritina+H] (m/z) 315.0812, calculado 315.0869

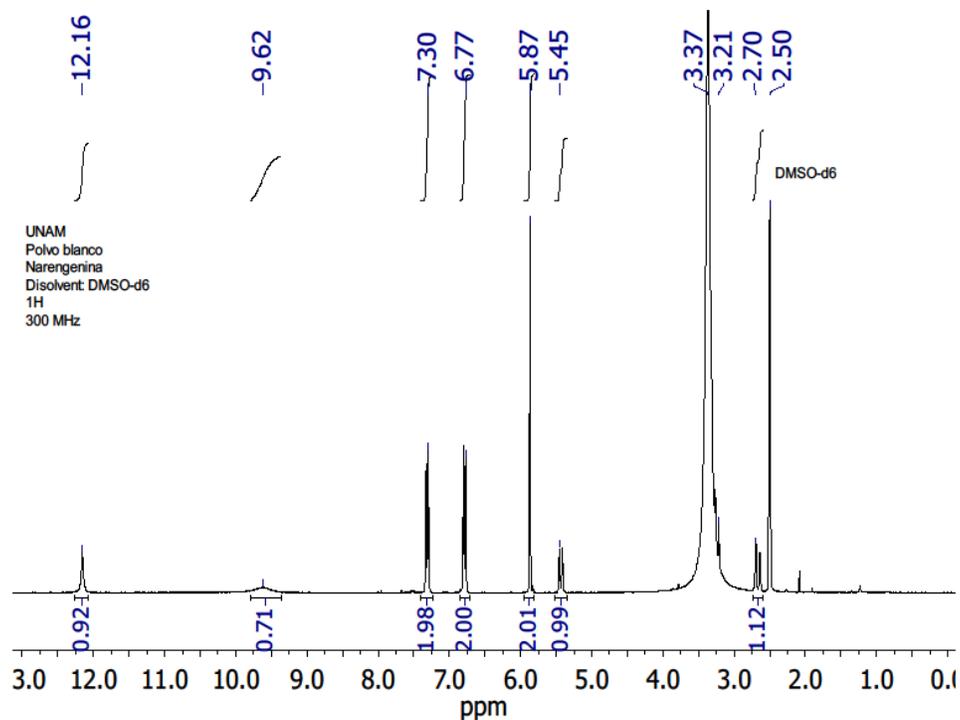


Confirmación química del compuesto naringenina obtenida de la fracción 71-85 del extracto de acetato de etilo de *Lippia graveolens* por RMN-¹H, RMN-¹³C.

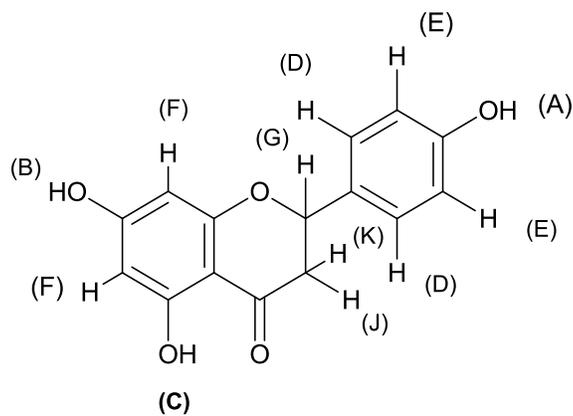
Comparación de espectros de Resonancia Magnética Nuclear ¹H y ¹³C de Naringenina tomado de Spectral Data Base for Organic Compounds



Espectros **RMN-¹H** de naringenina en DMSO-*d*₆ reportado



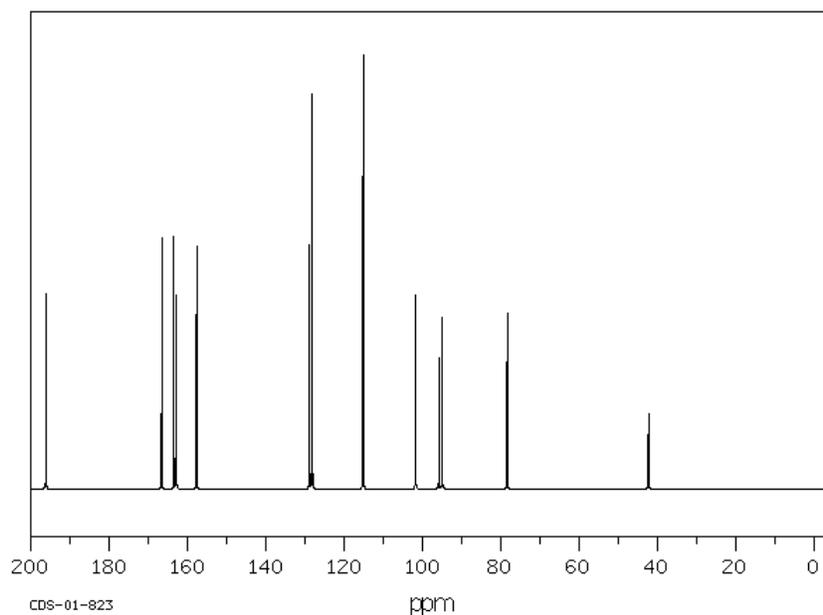
Espectro $\text{RMN-}^1\text{H}$ del compuesto asignado como naringenina en $\text{DMSO-}d_6$



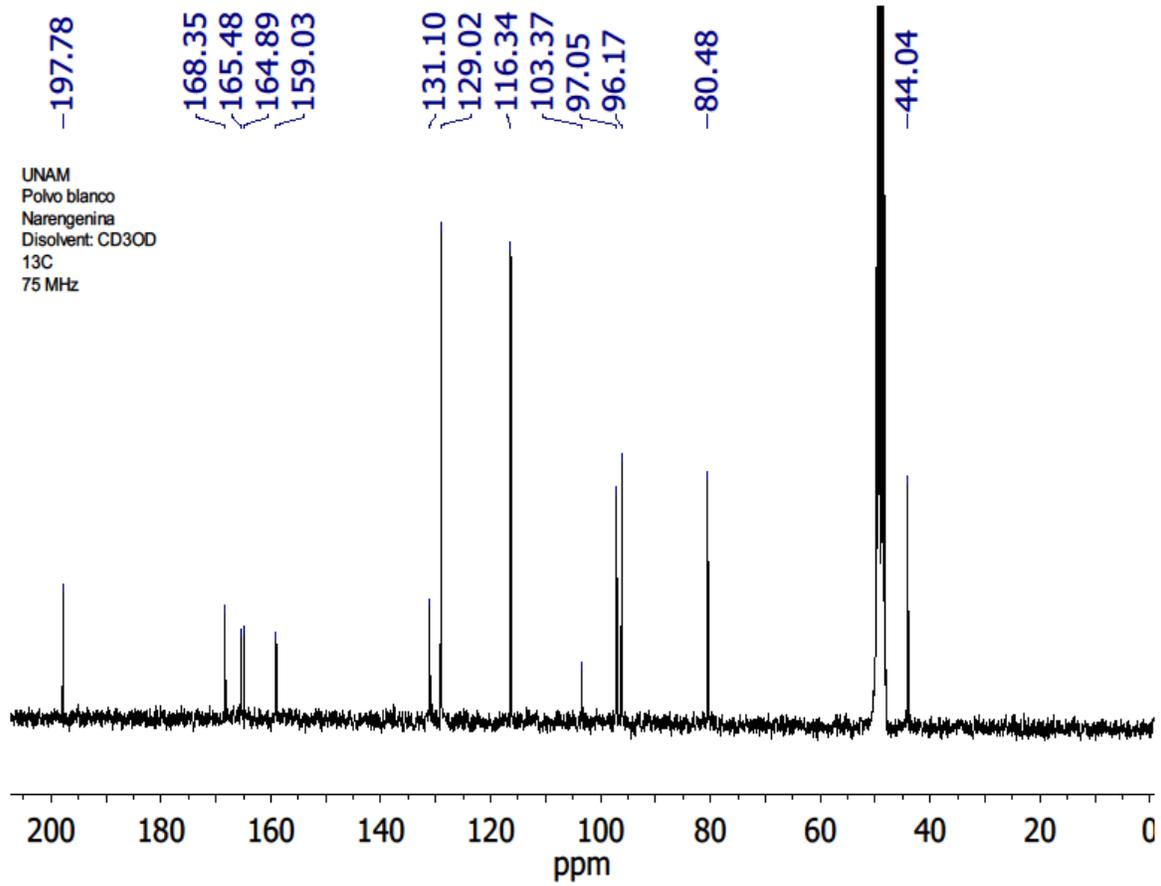
Las señales de $\text{RMN-}^1\text{H}$, $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ del compuesto blanco coinciden muy bien en desplazamiento químico y multiplicidad con las reportadas para naringenina en Spectral Data Base for Organic Compounds

	Desplazamiento reportado(ppm)	Desplazamiento químico espectro obtenido
A	12.2	12.16
B	10.8	No aparece*
C	9.6	9.62
D	7.322	7.30
E	6.811	6.77
F	5.904	5.87
G	5.434	5.45
J	3.259	3.21
K	2.689	2.70

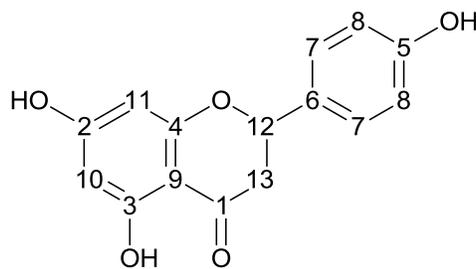
*La señal que corresponde al grupo OH (B) no aparece en el espectro obtenido, lo cual es esperado debido al intercambio con átomos de deuterio del disolvente o si el disolvente tiene agua como se observa en la señal de 3.3 ppm



Espectro $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ de Naringenina en $\text{DMSO-}d_6$ reportado



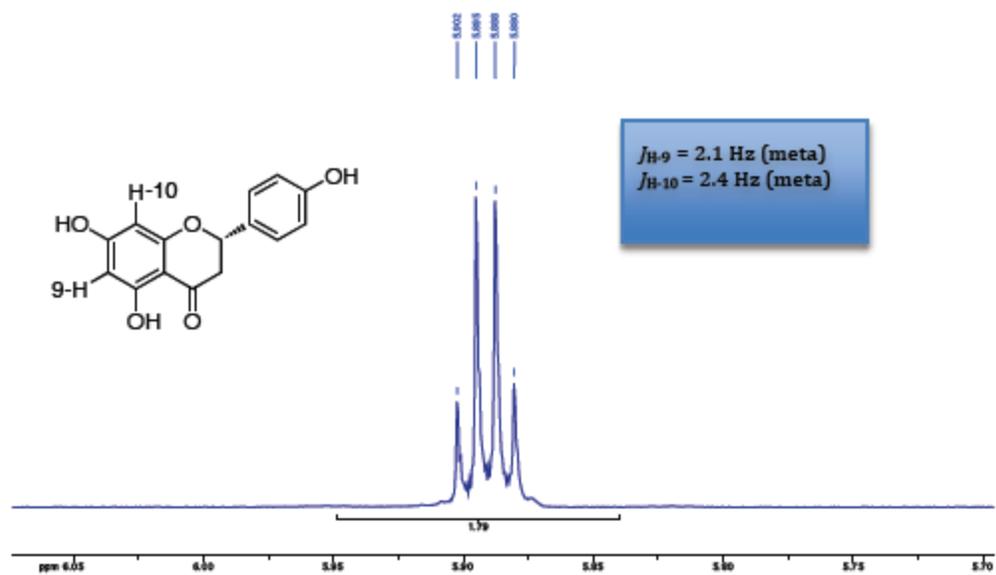
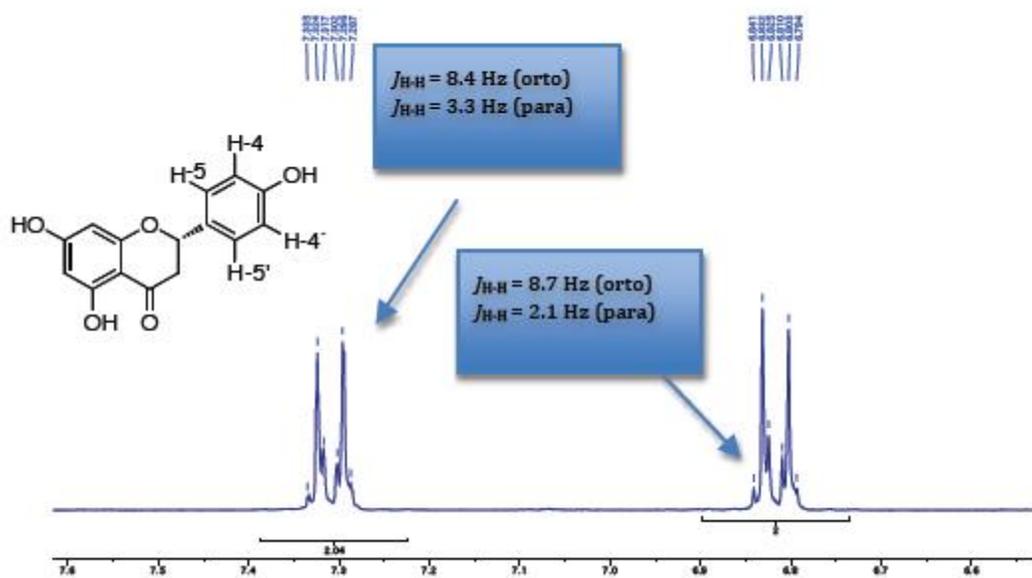
Espectro RMN-¹³C del compuesto asignado como Naringenina en CD₃OD

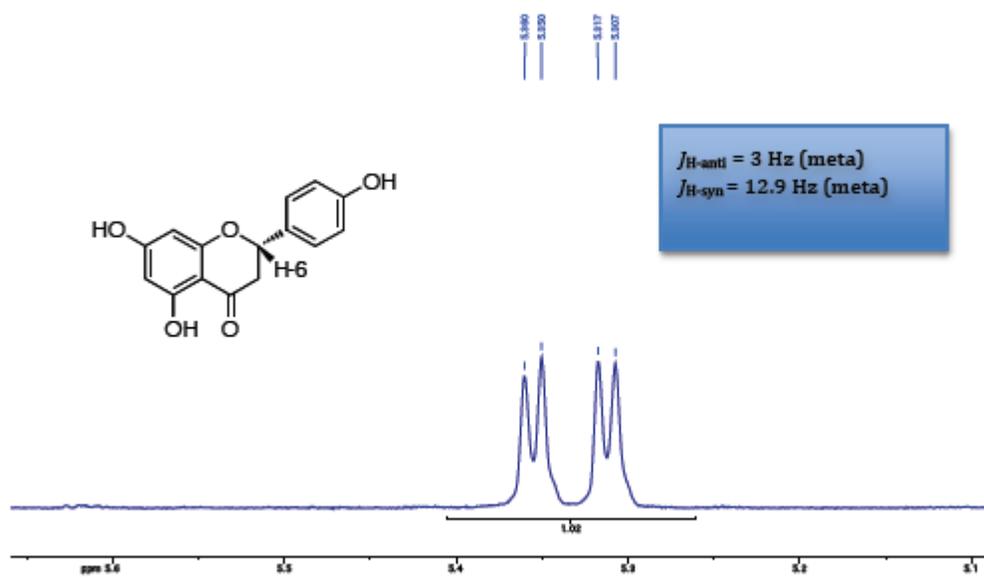


Desplazamiento reportado (ppm) obtenido (ppm) en DMSO-d		Desplazamiento en CD3-OD*
1	196.14	197.78
2	166.59	168.35
3	163.46	165.48
4	162.86	164.89
5	157.67	159.03
6	128.84	131.10
7	128.15	129.02
8	115.15	116.34
9	101.77	103.37
10	95.79	97.05
11	94.95	96.17
12	78.36	80.48
13	42.31	44.04

- Por solubilidad se utilizó CD₃OD para el análisis de ¹³C- RMN

Análisis de los parámetros de acoplamiento J para Naringenina





Confirmación química de la mezcla ρ -cimeno + timol obtenida de la fracción 13-22 del extracto de acetato de etilo de *Lippia graveolens* por EM.

Ión molecular de ρ -cimeno (m/z) 137.12

Ión molecular de timol (m/z) 151.11

