



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Estudio Fitoquímico y evaluación Neurofarmacológica de los “toronjiles”, *Clinopodium mexicanum*, *Dracocephalum moldavica* y *Agastache mexicana* subesp. *mexicana* y subesp. *xolocotziana*, utilizados en la medicina tradicional Mexicana como tranquilizantes.**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA:  
M. en C. Q. ROSA ESTRADA REYES**

**TUTOR: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:  
DRA. MILAGROS MÉNDEZ UBACH, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR,  
UNAM  
DR. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR,  
UNAM  
DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA,  
UNAM**

**México, diciembre 2015.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **SINODALES**

Presidente: Dr. Manuel Jiménez Estrada  
Secretario: Dr. Mariano Martínez Vázquez  
Vocal: Dra. Hortensia Parra Delgado  
Vocal: Dra. Carolina López Rubalcava  
Vocal: Dr. Rogelio Arellano Ostoa

## RECONOCIMIENTOS

La presente tesis fue realizada gracias al apoyo de:

Beca Nacional de Doctorado del  
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Para Realizar Estudios de  
Doctorado en el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la  
Universidad Nacional Autónoma de México.

CONACYT

No. de becario

185597

Al apoyo del INPRFM

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez

Gracias



## Resumen

Hoy día, los trastornos de ansiedad y depresión son considerados, a nivel mundial, problemas de salud pública con indicadores que predicen el aumento de su incidencia de forma importante. Ante este panorama, es importante la investigación en búsqueda de fármacos, con mejores propiedades farmacológicas y menores efectos colaterales, para el tratamiento de estas enfermedades. Entre las diferentes vertientes para la búsqueda de nuevos fármacos antidepresivos y ansiolíticos se encuentra la basada en los extractos y metabolitos secundarios provenientes de plantas medicinales. La Organización Mundial de la Salud reconoce la utilidad de las plantas para el tratamiento de los denominados síndromes de filiación cultural, tales como “el susto”, “la tristeza”, “la pérdida del alma”, los cuales al manifestarse en el entorno cultural de un sector importante de la población mexicana refleja los trastornos mentales que aquejan hoy en día a la población en general.

Los “toronjiles” son plantas medicinales utilizadas en México, para el tratamiento de síndromes de filiación cultural, como “el susto”, “los nervios”, “el espanto”. A pesar de su importancia en la medicina tradicional mexicana, la información formal sobre su composición química y propiedades farmacológicas hasta el presente trabajo, era escasa o inexistente.

El objetivo de esta investigación fue relacionar los efectos ansiolíticos y sedantes de los extractos acuosos de los “toronjiles”, *Clinopodium mexicanum*, *Dracocephalum moldavica*, *Agastache mexicana* subespecie *mexicana* y *Agastache mexicana* subespecie *xolocotziana*, con la presencia, en los extractos bioactivos, de algunos metabolitos secundarios de tipo flavonoide.

Tomando en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se presentan y discuten los resultados de los estudios tanto de composición química como de efectos farmacológicos de estas especies.

Los resultados indicaron que los extractos acuosos de las cuatro especies estudiadas, *Clinopodium mexicanum*, *Dracocephalum moldavica*, *Agastache mexicana subespecie mexicana* y *Agastache mexicana subespecie xolocotziana*, todas ellas pertenecientes a la familia Lamiaceae, produjeron efectos sedantes a dosis altas, mientras que, en dosis menores, ambas subespecies de *A. mexicana* indujeron efectos de tipo ansiolítico en ratones. *Clinopodium mexicanum* además, produjo un efecto antinociceptivo significativo. El análisis químico exhaustivo de las cuatro especies reveló un alto contenido de flavonoides tanto en forma libre como glicosilados, se aislaron e identificaron un total de 21 flavonoides, cinco de ellos comunes a las cuatro especies. A partir de los extractos acuosos de ambas subespecies de *Agastache mexicana* y en *Dracocephalum moldavica* se identificó al 7-O-glucósido de acetina y su derivado esterificado, el 6''-malato de 7-O- glucosil acetina como productos mayoritarios. Mientras que, el producto mayoritario de *C. mexicanum* fue el rutinósido de flavanona, 2 (S)-neoponcirina (NEO), la evaluación NEO en modelos de conducta, indicó que, NEO posee efectos antinociceptivo y de tipo ansiolítico, evidenciando a este como uno de los metabolitos secundarios responsables de los efectos de *C. mexicanum*. Aún más, la coadministración de NEO y picrotoxina, un antagonista selectivo del sistema GABAérgico, bloqueó su efecto ansiolítico. Por el contrario el efecto ansiolítico de NEO se incrementó cuando fue co-administrado el antagonista GABAérgico muscimol. Estos hallazgos demostraron que la neoponcirina

ejerce su efecto de tipo ansiolítico mediante de su interacción con el sistema GABAérgico.

Estos resultados en su conjunto, sugieren que los metabolitos secundarios de tipo flavonoide son los responsables de los efectos ansiolíticos y sedantes de los “toronjiles” y que dichos efectos son mediados al menos en parte por el sistema GABAérgico.

La evaluación de uno de los principios activos aporta evidencia de la interacción del sistema GABAérgico con los flavonoides, como responsables de los efectos ansiolíticos y sedantes de las especies estudiadas.

Adicionalmente, estos resultados apoyan el uso popular de “los toronjiles” como un remedio para inducir el sueño y como tranquilizante.

**Abstract**

Nowadays, the anxiety and depression disorders are considered at globally, a public health problem, with indicators that predict significantly increased incidence. In this context, it is important to continue the research in search for drugs with improved properties and fewer side effects, to achieve this there are several approaches, among which, the based on extracts and secondary metabolites from medicinal plants is one. At the present time, the World Health Organization (WHO) recognizes the usefulness of medicinal plants for the treatment of so-called cultural affiliation syndromes, such as "el susto" (fright), "la tristeza" (sadness), "la pérdida del alma" (soul loss). These syndromes manifesting itself within the cultural environment of an important sector of the Mexican population reflects the mental disorders that affecting nowadays to the general population

The "toronjiles" are Mexican medicinal plants used for the treatment of syndromes of cultural affiliation, as "the sadness", "the nerves", and "the fear". Despite its importance in the Mexican traditional medicine, the formal information about its chemical composition and pharmacological properties, until the present work, it was scarce or nonexistent.

Aim of the present research was to find the relationship between, the anxiolytic and sedative effects and the flavonoid-type secondary metabolites, present within aqueous extracts of the "toronjiles": *Clinopodium mexicanum*, *Dracocephalum moldavica*, *Agastache mexicana* subspecies *mexicana* and *Agastache mexicana* subspecies *xolocotziana*.

Taking into account the above in the present work are presented and discussed the results of both chemical composition and neuropharmacological effects of the studies of those species.

The results indicated that all aqueous extracts; from *C. mexicanum*, *D. moldavica*, *A. mexicana* subspecies *mexicana* and *A. mexicana* subspecies *xolocotziana*, all these belonging to the family Lamiaceae, produced sedative effects at high doses. While, at lower doses both *A. mexicana* subspecies induced anxiolytic effects in mice.

Additionally, *C. mexicanum* produced a significant anti-nociceptive dose-dependent effect in mice. The exhaustive chemical analysis of these species revealed a high content of both free flavonoids as glycosides. A total of 21 flavonoids, five of them common to the four species were isolated and identified. The 7-O- $\beta$ -glucoside acacetin and its esterified derivative, the 7-O- $\beta$ -(6''-maloyl) glucoside acacetin were the major secondary metabolite from the aqueous extracts of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* and subsp. *xolocotziana* and *Dracocephalum moldavica*. Whereas, the rutinoid 2S - neoponcirina (NEO) was the major product of *C. mexicanum* aqueous extract. NEO produced anti-nociceptive and anxiolytic effects in behavioral models in mice. These results showed that NEO is one of active compounds responsible for *C. mexicanum* effects. Furthermore, picrotoxin, a GABAergic antagonist was able to block the NEO anxiolytic effect. While the co-administered, NEO and muscimol, a GABAergic agonist at subthreshold doses enhancement its anxiolytic effect. These findings demonstrate that neoponcirina exerts its anxiolytic effect through its interaction with the GABAergic system. These results together suggest that flavonoid compounds are the responsible of

"toronjiles" anxiolytic and sedative effects by means of their interaction at least in part with the GABAergic system.

In addition, these approaches highlight the importance of the particularities structural the flavonoids, which are crucial for their neuropharmacological effect.

The dosage is another issue to consider. For example, it was observed that extract at low doses both species of *Agastache* induces anxiolytic effects, but at higher doses they induce sedative effects.

Additionally, these results support the popular use of "toronjiles" as a remedy for sleep and as a tranquilizer.

---

CM	extracto acuoso de <i>Clinopodium mexicanum</i> Benth. Govaerts
Amm	extracto acuoso de las partes aéreas de <i>Agastache mexicana</i> subespecie <i>mexicana</i>
Amx	extracto acuoso de las partes aéreas de <i>Agastache mexicana</i> subespecie <i>xolocotziana</i>
AINE	Antiinflamatorios no esteroidal Modelo de la conducta exploratoria ante un ambiente
AEBT	aversivo
BDZ	benzodiazepinas
BBT	modelo la conducta de enterramiento
COX	ciclooxigenasa
CLAR-EM	Cromatografía de líquidos de alta resolución-acoplado a espectro de masas
DM	extracto acuoso de las partes aéreas de <i>Dracocephalum moldavica</i> Linn
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DIM	desipramina
DZ	diazepam
DSM V	Manual de estadística de las enfermedades mentales V
FST	modelos de nado forzado
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
GABA	Ácido gama amino butírico
GABA/BDZ	Ácido gama amino butírico/benzodiazepinas
IESM-OMS	Informe de la evaluación del sistema de salud mental en México de la Organización mundial de la Salud
[ <sup>3</sup> H]-TBOB	[ <sup>3</sup> H]-terbutil-biciclo,ortobenzoato
HSQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
DALYs	años de vida ajustados por discapacidad
i.p.	intraperitoneal
IB	ibuprofeno

IMI	imipramina
J	Constante de acoplamiento
MUS	muscimol
NMDA	N-metil-D-aspartato
NEO	2S-neoponcirina
OMS	Organización Mundial de la Salud
PB	pentobarbital sódico
PTZ	pentilentetrazol
PTX	picrotoxina
<sup>13</sup> C-RMN	Resonancia magnética de carbono 13
TST	Modelo de suspensión de la cola
SNC	Sistema Nervioso Central



Resumen	
Abstract	
Abreviaciones	
Introducción	17
Antecedentes	23
<i>Clinopodium mexicanum</i> Benth. Govaerts	23
<i>Dracocephalum moldavica</i>	25
<i>Agastache mexicana</i> subespecies <i>mexicana</i> y <i>xolocotziana</i>	25
La medicina tradicional y los trastornos mentales	26
<i>Ansiedad</i>	28
Neurobiología de la ansiedad	29
Sedación, hipnosis y Sistema GABAérgico	32
Nocicepción y dolor	30
Objetivo	36
Objetivos particulares	37
Justificación	39
Discusión	41
Conclusiones	84
Referencias	87
Información complementaria	97
<i>Material vegetal</i>	
<i>Estudio fitoquímico de los extractos orgánicos</i>	
Datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos de los metabolitos secundarios aislados a partir de:	
<i>Clinopodium mexicanum</i> ,	

*Dracocephalum moldavica* y

*Agastache mexicana* subespecie *mexicana* y *xolocotziana*.

Caracterización química de los extractos acuosos de las cuatro especies estudiadas, mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con acoplamiento a Espectrometría de Masas (CLAR-EM).

Publicaciones

143

Rosa Estrada-Reyes, Eva Aguirre Hernández, Aída García-Argáez, Marcos Soto Hernández, Edelmira Linares, Robert Bye, Gerardo Heinze and Mariano Martínez-Vázquez.. 2004. .Comparative Chemical Composition of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 685-694.

R. Estrada-Reyes, M. Martínez-Vázquez, A. Gallegos-Solís, G. Heinze, and J. Moreno.2010. Depressant Effects of *Clinopodium mexicanum* Benth. Govaerts (Lamiaceae) on the Central Nervous System. *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 1-8.

M. Martínez-Vázquez, R. Estrada-Reyes, M Martínez-Laurrabaquio, C. López-Rubalcava y G. Heinze. 2012. Neuropharmacological study of *Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae) in mice: Sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract. *Journal Ethnopharmacology*, 141, 908-917

Rosa Estrada-Reyes, C. López-Rubalcava, Octavio Alberto Ferreyra-Cruz Ana María Dorantes-Barrón, G. Heinze, Julia Moreno Aguilar, Mariano Martínez-Vázquez.. 2014. Central nervous system effects and chemical composition of two subspecies of *Agastache mexicana*; an ethnomedicine of Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 153, 98-110.

J. Cassani, A.G. Escalona Araujo, M. Martínez-Vázquez, G. Heinze, J. Moreno, and R. Estrada-Reyes. 2013. .Anxiolytic-like and antinociceptive effects of 2S - Neoponcirin in mice. *Molecules*, 18, 7584-7599.

Estrada-Reyes R., Ubaldo-Suarez D., Araujo-Escalona A.G. 2012. Los Flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Revista Salud Mental*, 35 (5), 375-384.

# *Introducción*

Hoy México enfrenta una problemática muy compleja en materia de salud pública. Paradójicamente, sufrimos todavía enfermedades del subdesarrollo, como las asociadas a padecimientos infecciosos y desnutrición y al mismo tiempo enfrentamos padecimientos de los países avanzados, como el cáncer, la obesidad, las cardiopatías y la diabetes. Siendo estos últimos, enfermedades que impactan directamente en la salud mental de los individuos (informe IESM-OMS 2011).

La OMS describe la salud mental como: “un estado de bienestar en el cual el individuo se da cuenta de sus propias aptitudes, puede afrontar las presiones normales de la vida, puede trabajar productiva y fructíferamente y es capaz de hacer una contribución a su comunidad” (OMS, 2001a).

En este sentido, la salud mental es la base para el bienestar y funcionamiento de un individuo y su comunidad. Este concepto medular de la salud mental es consistente con su interpretación amplia y variada en las diferentes culturas y en particular en México donde la sociedad tiene una gran diversidad cultural, económica y social.

A nivel mundial, los trastornos mentales y de conducta representan el 11 % de la carga total de enfermedad, expresado en términos de años de vida ajustados por discapacidad (DALYs por sus siglas en inglés; OMS 2001b). Se predice que para el 2020 esta tendencia va a aumentar a un 15 %. Los problemas de salud mental también resultan otros costos para la sociedad (OMS, 2003; Medina-Mora *et al.*, 2012). La depresión fue la cuarta causa más importante de aportación a la carga de enfermedad y se espera que para el 2020 sea la segunda causa en importancia después de la enfermedad cardíaca

isquémica. Los trastornos de ansiedad afectan del 10 al 15 % de la población general y tienden a incrementarse debido a los factores estresantes ambientales y a los problemas socioeconómicos actuales (DSM V, Rodríguez-Landa y cols., 1998).

Por otro lado, el 80 % de la población mundial usa plantas como fuente primaria de agentes medicinales, por lo tanto no es sorprendente encontrar que en diversos países del mundo exista un sistema bien establecido de medicina tradicional, en donde los remedios están recopilados (Base de datos Napralet; Duke, 2003).

El uso de las plantas con efectos sobre el Sistema Nervioso Central (SNC), ha formado parte de la experiencia humana. Así, una gran cantidad de especies vegetales han sido utilizadas por sociedades antiguas dentro de un ámbito mágico y religioso, esta práctica milenaria ha generado información valiosa para la investigación científica en busca de los principios activos de muchas especies y su utilización en la medicina moderna. De tal forma que la investigación en productos naturales, ha conducido al descubrimiento de sustancias que hoy en día tienen un papel importante en el tratamiento de los trastornos mentales. México cuenta con una gran tradición en el uso de plantas para el tratamiento de diversas enfermedades, derivado de esta tradición, una gran variedad de especies son conocidas por sus efectos sobre el SNC, ejemplo de ellas son: las pasifloras (*pasiflora spp.*), la hierba de la pastora (*salvia divinorum*), los toloaches (*Datura spp.*) y los toronjiles (*Agastache mexicana*, *Clinopodium mexicana*, *Dracocephalum moldavica*), entre otras.

Los “toronjiles” han sido utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades o padecimientos tales como dolor de estómago, dolor durante el

parto, nervios, susto, espanto, dolor del corazón, fiebre y espasmos, entre otros. Aunque, los toronjiles son conocidos desde la época prehispánica, sus usos han cambiado a través del tiempo de manera que actualmente estas especies son empleadas exclusivamente en el tratamiento de desórdenes del sueño, como el insomnio, para “los nervios”, “las impresiones fuertes”, “el susto” o como tranquilizantes (Catálogo de plantas del Herbario del IMSS, 1995; Bye *et al.*, 1987; Santillán-Ramírez *et al.*, 2008).

Los toronjiles son empleados como remedios herbolarios solos o en combinación con otras plantas como: La flor de manita (*Chiranthodendron* spp.), la tila (*Ternstroemia* spp.), el hinojo (*Foeniculum vulgare*) y el toronjil azul, (*Dracocephalum moldavica*). Siendo el llamado complejo de los “tres toronjiles”, la combinación más conocida y empleada en la medicina tradicional, este complejo es una mezcla de toronjil blanco, toronjil morado (*Agastache mexicana*) y toronjil azul o extranjero (*Dracocephalum moldavica*) (Linares *et al.*, 1999).

Aunque, no existen datos de producción de plantas medicinales, según un informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2012), el toronjil morado es una las 70 plantas medicinales de mayor consumo en México.

Estudios etnobotánicos realizados en los principales mercados de plantas medicinales de la ciudad de México han mostrado la relevancia económica del empleo de los toronjiles, la cual ha llevado al cultivo sistemático de *Agastache mexicana* (toronjil morado y blanco) y de *Dracocephalum moldavica*, conocida como toronjil azul o extranjero por ser de origen euroasiático y adaptada en México (Estrada-Reyes *et al.*, 2012).

Estas plantas son cultivadas principalmente en el municipio de Ozumba, en el Estado de México, de donde se abastece al mercado de Sonora, que es el mercado de plantas medicinales más grande de México, también en el estado de Morelos, Hidalgo y Puebla su cultivo es significativo (FAO, 2012).

Las especies pertenecientes a la familia Lamiaceae se caracterizan entre otras cosas, por la abundante presencia de metabolitos secundarios de tipo flavonoide, los cuales son útiles como marcadores quimiotaxonómicos, en la clasificación de esta familia (Harbone y Williams, 1998). Además estos metabolitos secundarios poseen diversas actividades farmacológicas entre las que se cuentan, por su importancia, sus efectos sobre el SNC (Estrada-Reyes *et al.*, 2013).

Por otro lado, hoy en día los trastornos mentales, tales como la depresión y la ansiedad son considerados a nivel mundial, problemas de salud pública. Con indicadores que predicen el aumento de su incidencia de forma importante (Medina-Mora *et al.*, 2012). Actualmente, se dispone de una variedad fármacos para el tratamiento de estos trastornos, sin embargo, aun presentan efectos colaterales indeseables. Es por ello que, se continúa con la búsqueda de nuevos fármacos con mejores propiedades y menores efectos colaterales. A este respecto, las plantas medicinales representan una fuente inagotable de moléculas bioactivas y posibles fármacos. Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud reconoce la utilidad de algunas de estas especies vegetales en el tratamiento de los llamados síndromes de filiación cultural, tales como “el susto”, “la tristeza”, “el espanto” o “la pérdida del alma”. Las cuales al manifestarse en el entorno cultural de un sector importante de la población mexicana reflejan los trastornos mentales que aquejan a la población



en general (OMS, HispanicHealth, 2011, Estrada-Reyes *et al.*, 2014). En este contexto, en la medicina tradicional mexicana existe un grupo de plantas medicinales conocidas como “toronjiles”, a las cuales se les atribuyen propiedades como “tranquilizantes nerviosos”, y para aliviar la “tristeza”, tratar “el susto” y “el espanto” y para paliar el dolor. Es importante mencionar que, la información formal tanto de su composición química, como de sus propiedades farmacológicas o más aun, la relación entre ambas es escasa o inexistente.

El objetivo de esta investigación fue relacionar los efectos ansiolíticos y sedantes de los extractos acuosos de los “toronjiles”, *Clinopodium mexicanum*, *Dracocephalum moldavica*, *Agastache mexicana* subespecie *mexicana* y *Agastache mexicana* subespecie *xolocotziana*, con la presencia, en los extractos bioactivos, de algunos metabolitos secundarios, de tipo flavonoide.

Tomando en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se presentan y discuten los resultados de los estudios tanto de composición química como de efectos farmacológicos de estas especies.

# *Antecedentes*

La familia Lamiaceae, comúnmente conocida como la familia de la menta, esta diversificada con una distribución cosmopolita, que comprende más de 6000 especies agrupadas en cerca de 220 géneros (Kotsos, 2007). Estas plantas tienen una amplia distribución geográfica mundial y se caracteriza por crecer en zonas húmedas y templadas. Algunas especies de esta familia son empleadas como plantas medicinales de manera universal. Otras, como la menta, la salvia, el tomillo, el orégano y el rosmarinus, tienen también importancia económica debido al contenido de los aceites esenciales o por su uso como condimento. La familia Lamiaceae se caracteriza por la presencia de metabolitos secundarios de tipo flavonoide, los cuales además de ser marcadores quimio-taxonómicos de los diversos géneros de esta familia (Harbone, 1998 y 1999; Barberan, 1992), son de importancia por la variedad de funciones que realizan en las plantas, además de poseer una gama de efectos farmacológicos en los mamíferos incluidos los seres humanos Estrada-Reyes *et al.*, 2004).

***Clinopodium mexicanum* Benth.**

**Govaerts** “toronjil de monte” o “toronjil de menta”, es una especie perteneciente a la familia Lamiaceae, del género *Clinopodium*, el cual está constituido por 284 especies (Harley y Granda, 2000). En México este género está representado por 13 especies distribuidas a lo largo de la



*Clinopodium mexicanum*

República Mexicana. Esta especie es empleada en la medicina tradicional mexicana en el tratamiento de “los nervios”, por sus propiedades

tranquilizantes y para el dolor de muelas (García, 2000). Sin embargo, no existe información sobre la química ni farmacología de esta especie.



*Dracocephalum moldavica*

***Dracocephalum moldavica*** “toronjil azul o toronjil extranjero” pertenece al género *Dracocephalum* también de la familia Lamiaceae y está conformado por 50 especies las cuales habitan principalmente en las regiones templadas del hemisferio norte. La

especie *Dracocephalum moldavica* Linn se encuentra en la zona occidental templada del Himalaya y Cachemira, a altitudes de 2000 y 2500 metros, extendiéndose hacia el norte de Asia y Europa. En donde es utilizada como tranquilizante e inductor del sueño. Actualmente es cultivada y comercializada de forma sistemática en México. Es así que, *Dracocephalum moldavica* L. es utilizada en infusión sola o en combinación con el toronjil morado y el toronjil blanco; combinación conocida en el mercado como “complejo de los tres toronjiles”, para tratar enfermedades relacionadas con los “nervios” y para tranquilizar a la gente cuando sufre de impresiones fuertes. Es importante mencionar que no existen informes sobre los efectos producidos esta especie sobre el SNC.

***Agastache mexicana* subesp. *mexicana* y *Agastache mexicana* subesp. *xolocotziana*** “toronjil morado” y “toronjil blanco” son empleados solos o en combinación, en el tratamiento de los “nervios”, y como tranquilizantes suaves (Extra-farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2004; linares *et al.*, 1995 y 1999) . Sin embargo, los

resultados de un estudio químico realizado en nuestro laboratorio, mostraron claras diferencias en la composición química de ambas especies, esto aunado a algunas diferencias taxonómicas apoyó su división en subespecies siendo el toronjil morado *A. mexicana* subespecie *mexicana* y el toronjil blanco *A. mexicana* subespecie *xolocotziana* (Estrada-Reyes *et al.*, 2004). A este respecto,



*Agastache mexicana*  
subesp. *mexicana*



*Agastache mexicana*  
subesp. *xolocotziana*

posean actividades biológicas diferentes, lo anterior, podría explicar

los resultados del único estudio de estas especies, realizado por Molina (2000) y colaboradores, en el cual se describen los efectos ansiogénicos de una especie de *A. mexicana*. Por lo anterior es importante realizar la evaluación de los efectos sobre el SNC de ambas especies.

### ***La medicina tradicional y los trastornos mentales***

La Organización Mundial de la Salud, como parte de un plan llamado de atención primaria de la salud. Creó el nombre genérico de Medicina Tradicional y la definió como "la suma de todos los conocimientos teóricos y prácticos, explicables o no, utilizados para el diagnóstico, prevención y supresión de trastornos físicos, mentales y sociales, basados exclusivamente en la

experiencia y en la observación, transmitidos verbalmente o por escrito de una generación a otra" (OMS, 2001a y 2001b).

Por otro lado, las enfermedades mentales son alteraciones de los procesos cognitivos y afectivos del desarrollo, consideradas como anormales con respecto al grupo social de referencia del cual proviene el individuo. Se puede tratar de alteraciones en el razonamiento, el comportamiento, la facultad de reconocer la realidad o de adaptarse a las condiciones de la vida (DSM IV).

Los estudios de medicina tradicional han identificado un conjunto de enfermedades que comúnmente se han definido como "folk", "populares", "tradicionales" o como "síndromes de filiación cultural" (Campos, 1997; Fagetti, 2003, Informe de la Secretaria de Salud del estado de Puebla, 2004). Los cuales, se explican tomando en cuenta la estrecha vinculación de la visión del mundo y la cultura de un pueblo al existir un conjunto de enfermedades que difiere en cuanto a sus principios etiológicos, nosológicos y curativos de las enfermedades que trata la medicina científica (Collado *et al.*, 1983; Diccionario enciclopédico de la medicina tradicional Mexicana, 2013).

El definir como "síndrome de filiación cultural" a una enfermedad como el empacho o el susto, nos permite dejar en claro que éstos también son producto de una construcción simbólica operada por un grupo humano con una cultura propia y que por tanto existen diferentes sistemas conceptuales sustentados en premisas, nociones y axiomas propios, que difieren sustancialmente de aquellos que rigen la medicina científica, pero que no por ello son menos efectivos o certeros, o menos válidos en su modo de operar. Entre los síndromes de filiación cultural más comunes encontramos: el susto, el daño por brujería, el aire, el mal de ojo, el empacho, la caída de mollera, la bilis, entre

muchas otras que son propias de un sistema terapéutico particular Según los principios que inspiran la medicina tradicional, la salud se preserva manteniendo el equilibrio físico, psíquico, espiritual y emocional, que se logra gracias al control de las emociones: tristeza, ira, enojo, envidia, codicia, vergüenza. Evitando todo tipo de excesos, como son comer demasiado, tomar alimentos y bebidas excesivamente fríos o calientes, o tener una actividad sexual muy intensa. Alejándose de las personas que han acumulado calor por diversos motivos: por el embarazo, el posparto, excesos sexuales o por haber hecho un coraje. Previniendo también el contagio o el contacto con protecciones que rechazan el daño (Zolla, 1998; IMSS y SSA, 1997; Almaguer *et al.*, 2003).

Así, el empleo de preparaciones medicinales hechas en su mayor parte de plantas constituye uno de los aspectos más interesantes de la terapéutica tradicional que es practicada hoy en día. Este conocimiento aporta una gran cantidad de información sobre diversas plantas que son utilizadas en el tratamiento de enfermedades mentales.

### ***Ansiedad***

La ansiedad es una emoción normal que permite la adaptación a nuevas situaciones. A veces su intensidad llega a ser patológica e interfiere negativamente el comportamiento de las personas que la padecen (Bouton *et al.*, 2001; DSM IV).

Desde el punto de vista patológico, la ansiedad se caracteriza por un sentimiento penetrante de aprensión, temor o angustia frente a algo que se

considera como amenazante. A veces, se asocia a un estado de irritabilidad con pérdida de la capacidad de concentración, actitudes agresivas, reacciones emocionales exacerbadas ante situaciones de peligro y síntomas somáticos que se manifiestan sobre diversos órganos y aparatos (opresión precordial, taquicardia, palpitaciones, sudoración, fatiga, cefaleas, mialgias, dolores articulares, micciones frecuentes, insomnio, molestias digestivas), todos estos síntomas persisten por periodos prolongados y son independientes de los estímulos externos que los provocan (Kaplan, 2002; DSM IV).

### ***Neurobiología de la ansiedad***

En cuanto a la neurobiología de la ansiedad, se propone que los sistemas de neurotransmisión noradrenérgico, serotoninérgico y GABAérgico, participan de forma importante en su modulación, de manera que un desequilibrio o mal funcionamiento de alguno de estos sistemas puede generar estados de ansiedad patológicos. Por ejemplo; en pacientes con trastorno de ansiedad se ha observado un déficit del ácido gama amino butírico (GABA), mientras que el tratamiento con fármacos con acciones agonistas GABAérgicas, disminuyen los estados ansiosos (Nicholson y Pascoem 1990; File, 1990; Petty, 1995). También, en animales de experimentación se ha observado que agonistas GABAérgicos producen un incremento en la función del GABA y reducen los niveles de ansiedad en pruebas conductuales (Millan, 2003; López-Rubalcava *et al.*, 2006).

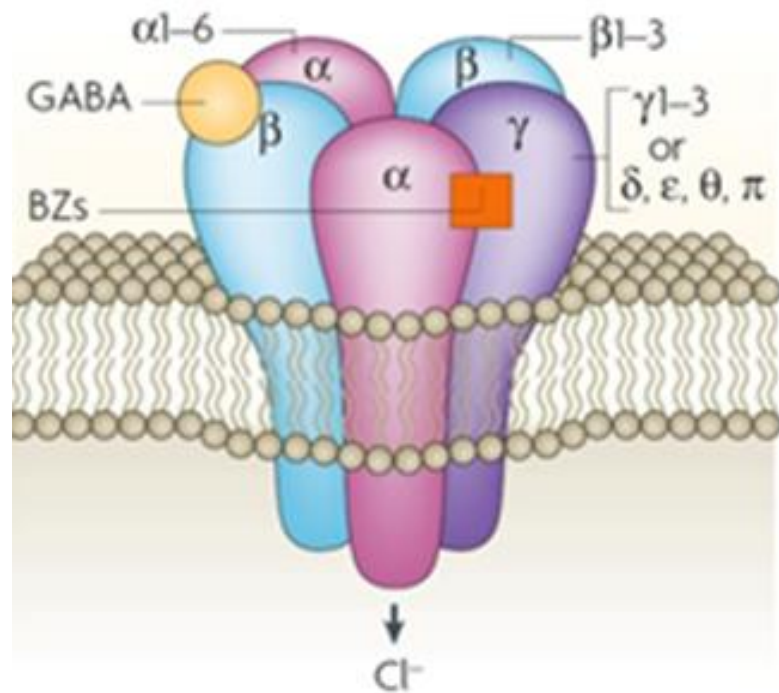
El GABA es un neurotransmisor inhibitor más importante y abundante del SNC, aproximadamente 30 % de las sinapsis son GABAérgicas. El GABA



controla el estado de excitabilidad neuronal en todas las áreas del cerebro. La inhibición ligera del sistema GABAérgico genera ansiedad, insomnio, hiperreactividad a estímulos no amenazadores y aumenta el nivel de alerta.

Hay dos tipos de receptores para el GABA; los receptores GABA<sub>B</sub> del tipo metabotrópico, que está acoplado a canales de Ca<sup>2+</sup> o K<sup>+</sup>, los cuales activan sistemas de segundos mensajeros en la célula vía proteínas G y dos de tipo ionotrópico, dependientes del ion cloruro; los receptores GABA<sub>A</sub> y el GABA<sub>C</sub>, los receptores GABA<sub>C</sub> que son un subgrupo de los receptores GABA<sub>A</sub> en el cual predomina la subunidad ρ (Hommer, 1987).

Los receptores GABA<sub>A</sub>, son proteínas pentaméricas situadas en la membrana plasmática, que conforman un canal iónico dependiente del ion cloruro (Cl<sup>-</sup>), cuyo ligando es el ácido gama amino butírico (GABA), cuando el GABA se une al receptor, el canal iónico se abre permitiendo la entrada del ion cloruro el cual produce la hiperpolarización de la membrana de la neurona receptora y la inhibición de la transmisión de los impulsos nerviosos. Estos receptores se distinguen claramente por sus subunidades, que en los mamíferos incluyen 7 clases distintas con múltiples variantes ( $\alpha_1$   $\alpha_6$ ,  $\beta_1$   $\alpha\beta_3$ ,  $\gamma_1$   $\alpha\gamma_3$ ,  $\rho_1$   $\alpha\rho_3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y teta). En la inter-fase de las subunidades  $\alpha$ - $\gamma$  pos-sinápticas, está un sitio sensible las BDZs, que al unirse a este sitio de refuerzo aumentan los efectos inhibitorios del GABA; con lo que los impulsos nerviosos en curso pueden ser inhibidos o quedar bloqueados completamente, de ahí que las benzodiazepinas son los fármacos de primera elección para el tratamiento de los trastornos de ansiedad (Olsen y Sieghart, 2008).

**Figura 1** Representación del receptor GABA<sub>A</sub>

Jacob et al., Nature Reviews Neuroscience, 2008

Las BDZ actúan aumentando la corriente de cloruro inducida por GABA. La presencia de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\gamma 2$  es un requisito indispensable para que la unión funcional de BDZ sea completa y la modulación de la corriente de cloruro sea óptima. La diversidad de ligandos GABA/BDZ, la cual resulta de la existencia de las subunidades ha sido implicada en las múltiples propiedades farmacológicas producidas por ligandos con escasa selectividad subtipo como el diazepam. Más aun, la heterogeneidad regional del complejo GABA/BDZ se ha sugerido como otra razón para la multiplicidad de propiedades farmacológicas de los ligandos a BDZ. (Haefely *et al.*, 1975 y 1989).

Además del sitio para benzodiazepinas, el receptor GABA<sub>A</sub> tiene otros sitios en los cuales pueden interactuar diferentes sustancias, como la

picrotoxina, que bloquea el funcionamiento del canal de cloro, los barbitúricos, el etanol y los esteroides. El GABA ejerce su acción de inhibición en las neuronas aumentando la permeabilidad al ion cloruro, y con ello haciendo más negativo el interior de la neurona. La entrada del ion tiene lugar a través de un poro o canal en la proteína, Ahora bien, aparentemente el efecto, tanto de las benzodiazepinas como de los barbitúricos, es el de aumentar la eficiencia de este proceso de entrada del cloruro a las neuronas. Como consecuencia de ello, en presencia de las benzodiazepinas o los barbitúricos, la acción inhibitoria del GABA es mayor. (Haefely *et al.*, 1990).

### ***Sedación e hipnosis***

Aunque sedación se ha definido más como un descenso en el nivel de conciencia, disminución en la actividad motora, alteración en el habla y la hipnosis como la no respuesta a estímulos verbales, la correlación a nivel molecular es similar. Sin embargo, a nivel neuro-anatómico se ha implicado el efecto sedante con estructuras corticales y la hipnosis con el tálamo. La sedación y la hipnosis se han relacionado con la inhibición de los receptores GABA<sub>A</sub> principalmente las subunidades  $\beta 2$  y  $\beta 3$ . La acción de las benzodiazepinas se relaciona con las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\beta 2$  del receptor GABA, con diferentes afinidades de acuerdo con la benzodiazepina empleada otorgando diferentes potencias, lo cual ha permitido el desarrollo de nuevas benzodiazepinas según su afinidad por las subunidades como el bretazenil e imidazenil.(Foster y Kemp, 2006).

Los barbitúricos ocasionan sedación e hipnosis actuando sobre el receptor GABA  $\beta_3$ , a concentraciones bajas mejoran el funcionamiento del receptor, al aumentar la concentración favorecen aún más la entrada de cloro sin necesidad de la unión a la subunidad del receptor. (Tietz *et al.*, 1989 y 1999, Chen *et al.*, 1999).

### ***Dolor y Nocicepción***

El dolor es una experiencia emocional (subjetiva) y sensorial (objetiva), generalmente desagradable, asociada a una lesión tisular o expresada como si ésta existiera (Reyes *et al.*, 2011; Bataille *et al.*, 1977). Es a partir de la década de 1960 que el tratamiento del dolor ha evolucionado del empirismo a la terapéutica que se obtiene del conocimiento de la fisiopatología del dolor.

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

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

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

- Dolor nociceptivo es el dolor producido por una estimulación de los nociceptores, es decir los receptores del dolor, provocando que el “mensaje doloroso” sea transmitido a través de vías ascendentes hacia

los centros supraespinales y sea percibido como una sensación dolorosa. Por ejemplo, un pinchazo o un estímulo térmico.

- Dolor neuropático: Es producido por una lesión directa sobre el sistema nervioso, de tal manera que el dolor se manifiesta ante estímulos mínimos o sin ellos y suele ser un dolor continuo.

Se denomina nocicepción a una serie de eventos neurofisiológicos producidos por la percepción de un daño, comprendidas en cuatro etapas principales: transducción, transmisión, modulación y percepción (Merskey Bogduk, 1994; Romera *et al.*, 2000).

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

La nocicepción se desencadena cuando se producen sustancias llamadas prostaglandinas. Estas sustancias a su vez son generadas por la acción de enzimas que actúan sobre otros componentes de las células. Una de esas enzimas es la llamada ciclooxigenasa (COX) de dos tipos: 1 y 2. La

ciclooxigenasa 1 se encuentra en todos los tejidos, mientras la ciclooxigenasa 2 sólo está en los sitios en que ocurre inflamación y dolor, y en el riñón, es por esto que los analgésicos tienen también propiedades antiinflamatorias y antipiréticas (controlan la fiebre) (Jon-Bin *et al.*, 2007). Finalmente, es importante mencionar que la modulación del dolor es un proceso dinámico complejo, el cual involucra la interacción de sistemas neurales ascendentes y descendentes, en los que participan diversos sistemas de neurotransmisión, como los sistemas opioide, histaminérgico, serotoninérgico, glutamatérgico, del óxido nítrico y noradrenérgico, entre otros (Villar, 2006).

# *Objetivos*

---

## OBJETIVO GENERAL

Relacionar los efectos ansiolíticos, sedantes y antinociceptivos de los extractos acuosos de las especies medicinales *Clinopodium mexicanum*, *Dracocephalum moldavica*, *Agastache mexicana* subespecie *mexicana* y *Agastache mexicana* subespecie *xolocotziana* con la presencia, en los extractos bioactivos, de algunos metabolitos secundarios.

### Objetivos particulares

1. Analizar la evaluación de las propiedades ansiolíticas y depresoras del sistema nervioso central de los extractos acuosos de las plantas medicinales *Clinopodium mexicanum*, *Dracocephalum moldavica*, *Agastache mexicana* subespecie *mexicana* y *Agastache mexicana* subespecie *xolocotziana* en modelos de conducta en ratones, publicados por la sustentante.
2. Analizar los resultados de los análisis químicos de los extractos acuosos activos de las especies *Clinopodium mexicanum*, *Dracocephalum moldavica*, *Agastache mexicana* subespecie *mexicana* y *Agastache mexicana* subespecie *xolocotziana* publicados por la sustentante
3. Discutir los resultados de la evaluación de los efectos del tipo ansiolíticos y antinociceptivos de la 2S-neoponcirina, aislada de *C. mexicanum* en modelos de conducta en ratones.

En este trabajo se analizarán y discutirán los resultados publicados por la postulante acerca de las evaluaciones neurofarmacológicas y análisis químicos de los extractos acuosos de *Clinopodium mexicanum*,



*Dracocephalum moldavica*, *Agastache mexicana* subespecie *mexicana* y *Agastache mexicana* subespecie *xolocotziana* utilizadas como remedios, en la medicina tradicional, contra síntomas definidos en la etnomedicina como “enfermedad de los nervios”, “sustos” y “espanto”.

Por lo tanto, los datos experimentales acerca de las evaluaciones neurofarmacológicas así como los procedimientos de los análisis químicos y otros datos experimentales se pueden consultar en las publicaciones respectivas y en la sección información complementaria.

## Justificación

Hoy México enfrenta una problemática muy compleja en relación a la salud pública. De manera paradójica, todavía enfermedades del subdesarrollo, como las asociadas a padecimientos infecciosos y desnutrición y al mismo tiempo enfrentamos los desafíos de los países avanzados, como el cáncer, la obesidad, las cardiopatías y la diabetes, siendo éstas, enfermedades que impactan directamente en la salud mental de los individuos.

En este sentido las plantas medicinales han mostrado ser una alternativa terapéutica importante para hacer frente a los retos de salud mental que enfrenta nuestro país.

Por ejemplo en la medicina tradicional el empleo de los “toronjiles” para el tratamiento de diversas enfermedades es conocido desde la época prehispánica, actualmente estas plantas son empleadas en el tratamiento de desórdenes como el insomnio, “nervios”, impresiones, “susto”, o por sus propiedades tranquilizantes.

Estudios etnobotánicos realizados en los principales mercados de plantas medicinales de la ciudad de México han mostrado la relevancia económica y etnomédica del empleo de estas plantas (Linares *et al*, 1999; Extra-farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos de México, 2001; Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales , 2010), la cual ha llevado al cultivo sistemático de *Agastache mexicana* subespecie *mexicana* y *Agastache mexicana* subespecie *xolocotziana* conocidos popularmente como toronjil morado y blanco respectivamente, y de *Dracocephalum moldavica* otra especie perteneciente a la familia Lamiaceae, conocida como toronjil azul o toronjil extranjero por ser de origen euroasiático y adaptada en México (Estrada-Reyes

*et al.*, 2012). Otra especie de la familia Lamiaceae es el *Clinopodium mexicanum*, conocida y ampliamente comercializada es el toronjil de menta o toronjil de monte la cual es utilizada al igual que los tres toronjiles para inducir el sueño, como tranquilizante nervioso y para el dolor de cabeza o de muelas (Aguilar *et al.*, 1994; García, 2000).

A pesar del amplio uso de estas plantas en la medicina tradicional mexicana, existe escasa información acerca de las propiedades farmacológicas atribuidas a estas especies.

Por anterior, resulta importante realizar una evaluación de las propiedades neurofarmacológicas de los “toronjiles”, así como conocer los posibles principios activos de estas plantas medicinales.

Este estudio aportara información importante para validar su uso de los toronjiles, como una alternativa terapéutica para paliar los problemas de salud mental en México.

# *Discusión*

En la medicina tradicional mexicana son utilizadas una gran variedad de especies vegetales para el tratamiento de los síndromes de filiación cultural, tales como el susto, la tristeza, la pérdida del alma. Los cuales, en el entorno cultural de un sector importante de la población mexicana reflejan los trastornos mentales que aquejan hoy en día a la población en general (De la Cruz, 1991; OMS, 2011).

Dentro de este grupo de especies vegetales sobresalen aquellas que se agrupan bajo el nombre genérico de “toronjiles”. De manera incidental los principales “toronjiles” utilizados en la medicina tradicional mexicana pertenecen a la familia Lamiaceae y se caracterizan entre otras cosas por sus agradables aromas (Valant-Vetschera *et al.*, 2003). Esto refleja cierta preferencia popular por plantas con olores atractivos para utilizarlas como remedios para las enfermedades de los “nervios”. Hoy en día se sabe que la mayoría de los aceites esenciales de las plantas aromáticas, entre ellas una gran gama de especies de la familia Lamiaceae son generalmente terpenoides principalmente mono y sesquiterpenos y que varios de ellos tienen actividad sobre el SNC (Estrada-Reyes *et al.*, 2013). Otro aspecto importante en el uso tradicional de los “toronjiles” es la ingesta de tés, infusiones acuosas o alcohólicas de estas especies vegetales. A pesar del intenso uso de los “toronjiles” en la medicina tradicional mexicana, no existen estudios ni químicos ni farmacológicos que avalen sus supuestas acciones terapéuticas. Tomando en cuenta lo anterior se decidió realizar un estudio sistemático de cuatro “toronjiles”. En el presente trabajo se analizan y discuten los resultados publicados por la postulante, sobre de los efectos, principalmente sedantes,

antinociceptivos y ansiolíticos, de los extractos acuosos de los “toronjiles” *Clinopodium mexicanum* (toronjil de monte), *Agastache mexicana* subespecie *mexicana* (toronjil morado), *Agastache mexicana* subespecie *xolocotziana* (toronjil blanco) y *Dracocephalum moldavica* (toronjil azul o chino). Por último se discutirá la actividad biológica de la 2S-neoponcirina, un rutinósido de flavanona aislado de *Clinopodium mexicanum*.

### ***Clinopodium mexicanum***

**Estrada-Reyes, R.**, Martínez-Vázquez, M., Gallegos-Solís, A., Heinze, G., and Moreno J. 2010. Depressant Effects of *Clinopodium mexicanum* Benth. *Govaerts (Lamiaceae)* on the Central Nervous System. *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 1-8.

Los resultados mostraron que un extracto acuoso de *Clinopodium mexicanum* (CM) ejerce efectos depresores sobre el SNC en ratones.

Existen diferentes modelos para evaluar el efecto sedante o depresores del SNC de moléculas o extractos de origen vegetal en animales de experimentación, una de las pruebas preliminares más aceptada es la del tiempo de sueño inducido por pentobarbital (PB) (López-Rubalcava et al., 2006), La acción farmacológica del PB es la depresión no selectiva del SNC que según la dosis puede ir desde la sedación, hasta la anestesia general (Olsen et al., 1986). En una primera aproximación, ratones administrados con CM a dosis de 100 a 1000 mg/kg fueron evaluados en el modelo de inducción de sueño con PB, los resultados mostraron que CM produjo una disminución

del tiempo de latencia de hipnosis y un aumento en la duración del sueño inducido con PB, efectos considerados sedantes en este modelo (Estrada-Reyes *et al.*, 2010). Los barbitúricos son metabolizados en el hígado por lo que estos activan el sistema enzimático del citocromo P450, antes de ser conjugados con el glucagón y ser excretados por la orina, por lo que no puede descartarse la posibilidad que el incremento en el tiempo de sueño producido por CM se deba a una inhibición del metabolismo del PB, Sin embargo, en los receptores GABA<sub>A</sub>, los barbitúricos producen corrientes de cloruro mediado por el GABA al unirse al complejo receptor GABA<sub>A</sub> e incrementa la duración de la apertura del canal, produciendo una inhibición la despolarización neuronal al potenciar y prolongar las acciones de inhibición del GABA, con la consecuente acción depresora.

Las acciones de CM fueron comparables a las inducidas por diazepam (DZ; 2 mg/kg), una benzodiazepina (BDZ) clásica con efectos ansiolíticos y sedantes que incrementan los efectos depresores de los barbitúricos. Por lo que es posible que el efecto sedante producido por CM sea debido a su interacción con el receptor GABA<sub>A</sub> del sistema GABAérgico.

Para comprobar los efectos sedantes de CM, fueron evaluados en el modelo del el tablero con perforaciones, el cual se basa en la conducta natural de los roedores a explorar ambientes novedosos, en este modelo se puede medir la respuesta de los roedores a un entorno no familiar, con las ventajas de que varias conductas pueden ser fácilmente observadas y cuantificadas. En este modelo el número y tiempo de exploración que el ratón explora cualquiera de las perforaciones del tablero es un indicador de los niveles de ansiedad del sujeto experimental, de manera un aumento en la frecuencia y tiempo de

exploración es considerado como un efecto de tipo ansiolítico. Mientras que, una disminución de los mismos es un índice de actividad sedante o depresora del SNC (Viola *et al* 1995). Cuando ratones administrados con CM fueron evaluados en el modelo del tablero con perforaciones, éste produjo una disminución de las conductas exploratorias y de la actividad ambulatoria de los roedores, este efecto fue similar a los producidos por DZ. Estos resultados confirman el efecto sedante observado en la prueba de pentobarbital sódico.

En este mismo estudio se evaluaron los efectos de protección de CM contra las crisis convulsivas inducidas por pentilentetrazol (PTZ). El modelo de inducción química de convulsiones por pentilentetrazol es útil para evaluar las convulsiones clónico-tónicas en roedores, ya que son muy similares a las que se presentan en humanos, es el modelo de primera elección en la evaluación de la actividad anticonvulsivante de extractos y principios activos de plantas debido a que se busca que dichos sustancias funcionen como antagonistas al PTZ (Jarogniew y Xiaoqiong, 2007). Los resultados de esta evaluación mostraron que CM inhibió las crisis convulsivas inducidas por PTZ observándose un incremento en el tiempo de aparición de las crisis clónicas y un aumento en el tiempo de aparición de las crisis clónica-tónicas generalizadas. A demás CM redujo la incidencia de muerte de los sujetos experimentales hasta en un 50%.

A este respecto, se ha demostrado que una de las vía neurales de las convulsiones clónicas inducidas por PTZ se encuentra en el cerebro anterior mientras que el tronco cerebral está implicado en la génesis de las convulsiones tónicas.



Por lo que, es factible que CM contenga compuestos activos que eleven el umbral de las convulsiones clónicas iniciadas en el cerebro anterior y también disminuyan la propagación del efecto convulsivo a las estructuras del tallo cerebral. Otra posibilidad es que el aumento del tiempo de latencia de la convulsión podría estar relacionado con un efecto de inhibición de la actividad del SNC. Con el propósito de explorar los posibles mecanismos de acción de los efectos anticonvulsivos de CM, se evaluó también la actividad de CM contra las crisis convulsivas inducidas por picrotoxina, un antagonista selectivo, no competitivo, que bloquea los receptores GABA<sub>A</sub> impidiendo el flujo del ion cloruro a través del canal activado por GABA, reduce la conductancia al reducir la frecuencia y el tiempo promedio de apertura del canal, tal efecto provoca la aparición de crisis convulsivas. Los resultados mostraron que CM fue capaz de retrasar el inicio de las convulsiones inducidas por picrotoxina y a la dosis de 200 mg/kg, también fue capaz de prevenir completamente la muerte producida por picrotoxina. Este hecho confirma también, que CM produce una inhibición de la actividad del SNC, mediante una facilitación de la actividad GABAérgica, Se sabe que tanto PTZ como picrotoxina bloquean al receptor GABA<sub>A</sub> de una manera similar sin embargo, muestran características diferentes que indican que los dominios de su interacción no son idénticos, por ejemplo; picrotoxina no actúa sobre el sitio de reconocimiento del GABA, este produce una modulación alostérica cuando se une al canal mientras este permanece abierto, también se ha descrito que la picrotoxina puede unirse a los receptores GABA<sub>C</sub> y glicina y glutamato, mientras que el PTZ es un antagonista no competitivo del receptor GABA<sub>A</sub> que bloquea totalmente el canal iónico, interactúa con el sitio de acción de picrotoxin (Newland y Cul-Candy, 1992, Das, 2003). Estos resultados

sugieren que CM ejerce sus efectos anticonvulsivos mediante su interacción con los receptores GABA<sub>A</sub> a nivel post sináptico modificando la permeabilidad del canal de cloruro, sin embargo son necesarios estudios específicos para comprobar esto. Además las evidencias antes mencionadas podrían explicar por qué CM mostró una protección parcial no dependiente de la dosis contra las convulsiones inducidas por PTZ, mientras que este extracto mostró una protección dependiente de la dosis contra las convulsiones inducidas por picrotoxina.

En otro experimento, cuando CM fue administrado por vía intraperitoneal a animales que fueron sometidos a la prueba de la platina caliente, este produjo un efecto antinociceptivo, observado como un aumento en el tiempo de respuesta al estímulo térmico, este efecto se incrementó a medida que se aumentó la dosis, y fue similar al producido por el ketorolaco, un potente analgésico, inhibidor no selectivo de la COX, que se ha descrito eficaz en el ensayo de la placa caliente y cuya actividad anti-nociceptiva es comparada analgésicos opioides (Floyd, 1990). La modulación inhibitoria de la nocicepción producida por CM es debida a una inhibición de los potenciales de acción, que se propagan hacia el SNC, sin embargo las evidencias obtenidas no son suficientes para proponer un posible mecanismo de acción.

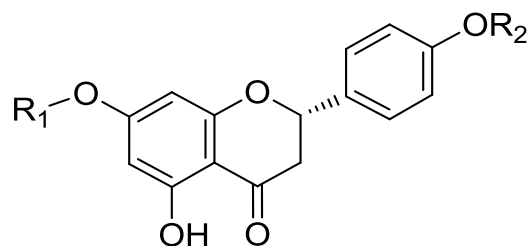
Estos resultados apoyan el uso tradicional de *Clinopodium mexicanum* como remedio para aliviar el dolor.

La toxicidad es una preocupación importante en el estudio farmacológico de extractos de plantas y nuevos principios activos. Por lo que se evaluó la toxicidad aguda producida por el extracto acuoso de *C. mexicanum*, a través de la determinación de su dosis letal media (LD<sub>50</sub>= 2850 mg/kg) (Lorke, 1983) la

cual resultado ser 10 veces mayor a la dosis con mayor potencia a la que ejerce su efecto sedante. En la interpretación de estos datos, es posible afirmar que *C. mexicanum* tiene ventana terapéutica amplia, cuando se administra de forma aguda.

En cuanto a la composición química del extracto acuoso de *C. mexicanum*, mediante técnicas de CLAR-EM, mostró la presencia de los glicósidos de las flavanonas: neoponcirina, poncirina e isonaringina. También se detectaron las flavonas 8-*OH*-salvigenina y gardenina B, así como las flavanonas naringenina y 4-*O*-metilnaringenina. (Figura 2).

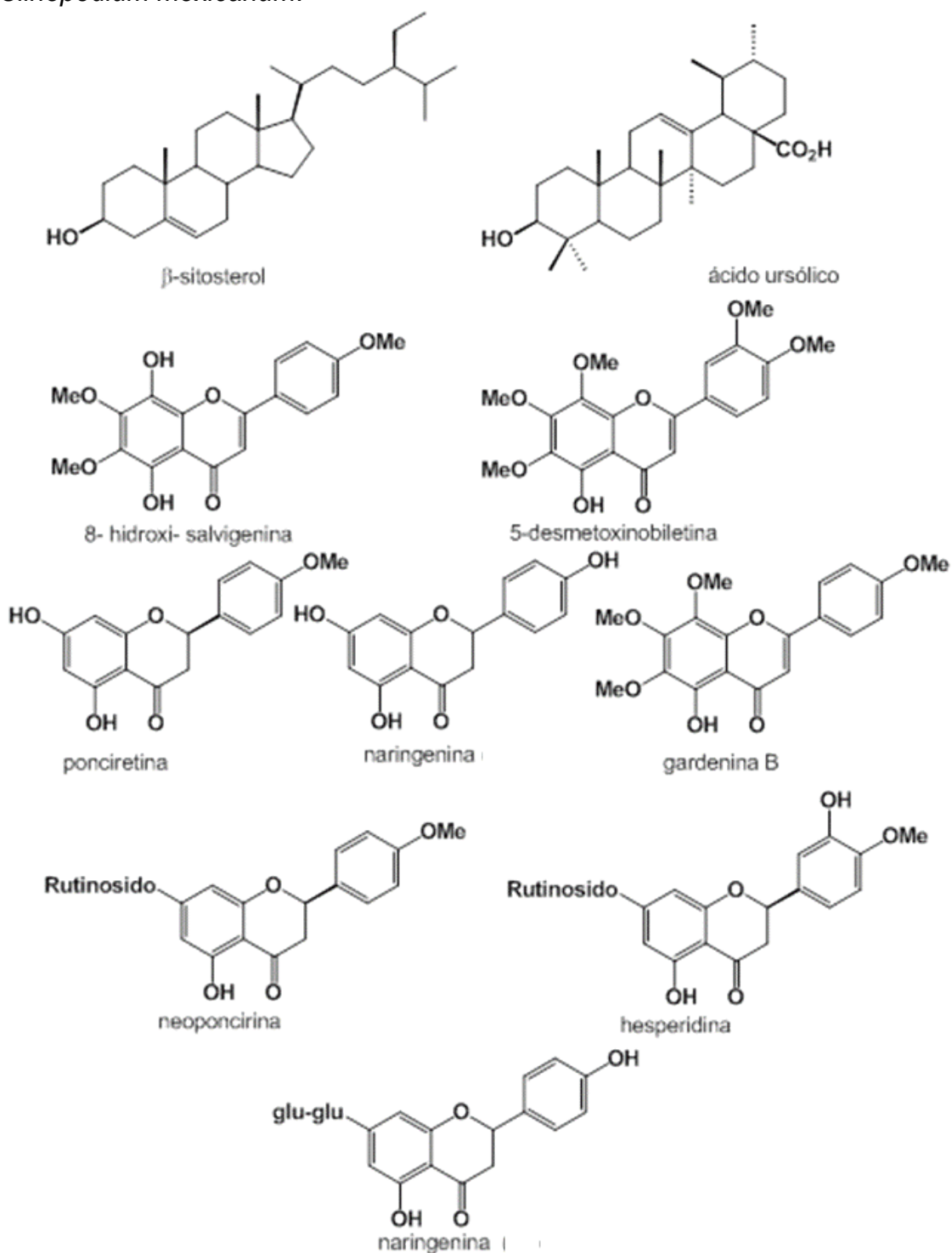
**Figura 2.** Principales compuestos de tipo flavonoide identificados en el extracto acuoso de *C. mexicanum*.



R<sub>1</sub>=Glc-2-Rha R<sub>2</sub>=Me poncirina  
 R<sub>1</sub>=Glc-6-Rha R<sub>2</sub>= Me neoponcirina  
 R<sub>1</sub>=Glc-2-Rha R<sub>2</sub>=H isonaringenina

Cabe mencionar que también se realizó el estudio fitoquímico exhaustivo de los extractos orgánicos de esta especie. En la figura 3 se representan los metabolitos secundarios aislado e identificados a partir de los extractos orgánicos de *C. mexicanum*.

**Figura 3** Metabolitos secundarios aislados de los extractos orgánicos de *Clinopodium mexicanum*.



La información sobre los efectos de metabolitos secundarios de tipo flavonoide es amplia, de han descrito los efectos ansiolíticos y/o sedantes de algunos agliconas y glicósidos de flavonoides, y se ha informado que algunos flavonoides se tienen afinidad por sitio de BDZ del receptor GABA<sub>A</sub> (Marder *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2004 y 2006). Es posible que la presencia en CM de 8-OH-salvigenina y gardenina B, así como las flavanonas, naringenina y 4-O-metilnaringenina y los glucósidos flavonoides, neoponcirina, poncirina e isonaringina sean responsables de sus efectos sobre el SNC.

En conclusión, este estudio reveló que una sola administración de un extracto acuoso de las partes aéreas de *Clinopodium mexicanum* produce efectos sedantes, anticonvulsivos y anti-termonociceptivos. Los resultados sugieren que los metabolitos secundarios de tipo flavonoide presentes en el extracto son responsables de los efectos producidos por CM y aportan evidencia de que estos efectos son producidos al menos en parte a un incremento de la actividad GABAérgica, en particular de los receptores GABA<sub>A</sub>. Adicionalmente, estos hallazgos apoyan el uso popular de *C. mexicanum* como remedio para inducir el sueño y como un tranquilizante.

### ***Dracocephalum moldavica***

M. Martínez-Vázquez, **R. Estrada-Reyes**, M Martínez-Laurrabaquio, C. López-Rubalcava y G. Heinze. 2012. Neuropharmacological study of *Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae) in mice: Sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract. *Journal Ethnopharmacology*, 141, 908-917.

*Dracocephalum moldavica* Linn., es otro “toronjil” conocido popularmente como toronjil azul o toronjil extranjero por ser de origen Euro-Asiático (Dastmalchi *et al.*, 2007; Najaafi *et al.*, 2009). A pesar de no ser de una planta Mexicana de origen, ésta ha sido adaptada en nuestro país, en donde es cultivada de forma sistemática y es ampliamente utilizada en la medicina tradicional, como remedio para el insomnio, para inducir sueño y como tranquilizante (Linares *et al.*, 1999). Como se mencionó en la sección de introducción, esta especie forma parte del complejo de los tres toronjiles, constituido por los toronjiles morado, blanco y azul, remedio herbolario para aliviar los “nervios”, como tranquilizante y para inducir el sueño. Se han descrito en la literatura los efectos ansiolíticos de especies de *Dracocephalum moldavica* cultivadas en algunas regiones de Rusia y Asia, atribuyendo sus efectos ansiolíticos a la abundante presencia del ácido rosmarínico (. Sin embargo, hasta el presente trabajo no se contaba con informes sobre de los efectos sedantes o ansiolíticos de *Dracocephalum moldavica* cultivada en México.

Tomando en cuenta lo anterior, se decidió evaluar los efectos neurofarmacológicos producidos por un extracto acuoso de las partes aéreas de *Dracocephalum moldavica* (DM) en varios modelos de conducta en ratones. Los resultados mostraron que cuando los animales administrados con DM fueron evaluados en el modelo de la conducta exploratoria ante un ambiente aversivo, DM produjo una disminución en la conductas de exploración evaluadas, efecto que en este modelo, podría ser considerado inespecífico o de tipo ansiogénico. Sin embargo, DM también produjo una disminución de la actividad ambulatoria de los sujetos experimentales, cuando fueron evaluados

en el modelo de campo abierto, por lo que el efecto observado en el modelo de la conducta exploratoria puede deberse a un efecto sedante. Estos resultados fueron similares a los producidos por diazepam a la dosis de 4 mg/kg, en este caso, el diazepam también disminuyó las conductas de exploración en el modelo de la conducta exploratoria ante un ambiente aversivo esta disminución, estuvo también asociada a una reducción de la actividad general en la prueba de campo abierto.

Los efectos sedantes de este extracto fueron confirmados en el modelo del tablero con perforaciones, en el cual los resultados mostraron que DM produjo una disminución estadísticamente significativa y de forma dependiente de la dosis en todas las conductas evaluadas en este modelo, una acción considerada como un efecto sedante. También, en la prueba de campo abierto DM disminuyó significativamente la actividad general de los ratones experimentales.

La prueba del rodillo giratorio o Rota-rod es un paradigma propuesto para evaluar la coordinación motora o efectos musculo relajantes de fármacos o principios activos (Estrada-Reyes *et al.*, 2012). Cuando los animales tratados con DM fueron evaluados en esta prueba, mostraron una disminución en el tiempo en que fueron capaces de mantenerse en sobre el rodillo giratorio (Rota-rod). Estos resultados indican que DM también redujo la coordinación motriz de forma similar al efecto producido por DZ a dosis altas (2-4 mg/kg). Disminución del tono muscular, disminución de la actividad ambulatoria y sedación son generalmente las manifestaciones producidas por dosis altas de algunas benzodiazepinas como DZ, que también disminuye el tiempo de permanencia de los roedores sobre el rodillo giratorio. Los resultados de estos

experimentos en su conjunto confirmaron que DM produjo efectos sedantes en roedores.

Otra prueba de la actividad sedante de DM fue proporcionada por la capacidad del extracto para incrementar el tiempo de sueño inducido por pentobarbital de sodio (PB). Como se mencionó antes, fármacos depresores del SNC, como el PB tienen un sitio de unión en el receptor GABA<sub>A</sub>, produciendo un aumento en la hiperpolarización mediada por GABA de las neuronas post-sinápticas. En este mismo experimento la participación del sistema GABAérgico fue confirmada, cuando se administró una dosis sub-umbral de PB (no suficiente para inducir el sueño por sí mismo) en combinación con DM, ambos compuestos indujeron sueño en los animales de prueba. Por ejemplo, la combinación de 30 mg/kg de SP y 200 mg/kg de DM produjo un efecto similar a la producida por la misma dosis de PB en combinación con 1 mg/kg de DZ. Estos resultados mostraron que existe una relación entre las capacidades de SP para inducir la sedación y el efecto sedante producido por DM. Por lo tanto, es posible que el sistema GABAérgico participe en el incremento inducido por DM en los efectos de la PB.

La prueba de nado forzado es un modelo útil, relativamente sencillo de realizar y reproducible, para predecir estados tipo depresivos en roedores. En esta prueba, inicialmente se induce a un estrés agudo en los ratones, cuando son forzados a nadar en un recipiente del cual no pueden escapar, desplegando una conducta pasiva o de inmovilidad, esta conducta se invierte por antidepresivos tales como imipramina (IMI) y cloripramina (CIM). Nuestros resultados mostraron que la administración i.p. de una sola dosis de DM indujo un aumento estadísticamente significativo del tiempo de inmovilidad, en una



manera opuesta al efecto inducido por el IMI y CIM, dos antidepresivos tricíclicos de uso clínico. Como se mencionó anteriormente, una reducción significativa en el tiempo de inmovilidad se considera un efecto tipo antidepresivo. Por el contrario, el aumento en el tiempo de inmovilidad observado después de la administración de DM podría ser una consecuencia de su efecto depresor de la actividad central. En este sentido, es bien sabido que la mayoría de los fármacos que aumentan la transmisión GABAérgica inducen sedación y somnolencia y no tienen efectos de tipo antidepresivo ni en animales ni en seres humanos. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar esta hipótesis. En cuanto a la composición química de DM, un análisis de espectro-fotométrico cuantitativo mostró una abundancia total de flavonoides del 16,6 %.

Además, DM dio positivo a las pruebas químicas para polifenoles, taninos, glucósidos, esteroides, pero no se encontró que contenía compuestos de tipo alcaloides. Hay varios informes acerca de la presencia, del ácido rosmarínico en los extractos acuoso y de metanol en especies de *Dracocephalum* cultivadas en algunas regiones de Asia y Europa y se han descrito los efectos de tipo ansiolítico en ratones del ácido rosmarínico (Takeda *et al.*, 1998). Tomando en cuenta lo anterior, se realizó un análisis químico mediante la técnica CLAR-EM, dirigido a la detección de este compuesto; sin embargo, el resultado fue negativo. Esta información resulta interesante, debido al hecho de que se ha descrito que el ácido rosmarínico junto con flavona apigenina son los responsables de los efectos ansiolíticos de las especies de *D. moldavica* colectadas en Rusia y Asia y la ausencia de este

metabolito en las colectas mexicanas podría explicar la ausencia del efecto ansiolítico en el presente estudio.

Otro objetivo fue evaluar los posibles riesgos tóxicos de DM. Para lograr este objetivo, la toxicidad aguda resultante de la administración por vía intraperitoneal de la DM se midió según el método de Lorke. Los resultados indicaron que a dosis más altas (500-1600 mg/kg) las manifestaciones tóxicas persisten hasta producir la muerte en un período de 36 h, siendo la  $DL_{50} = 470$  mg/kg. La toxicidad aguda indica que el consumo de DM podría implicar ligeros riesgos para la salud.

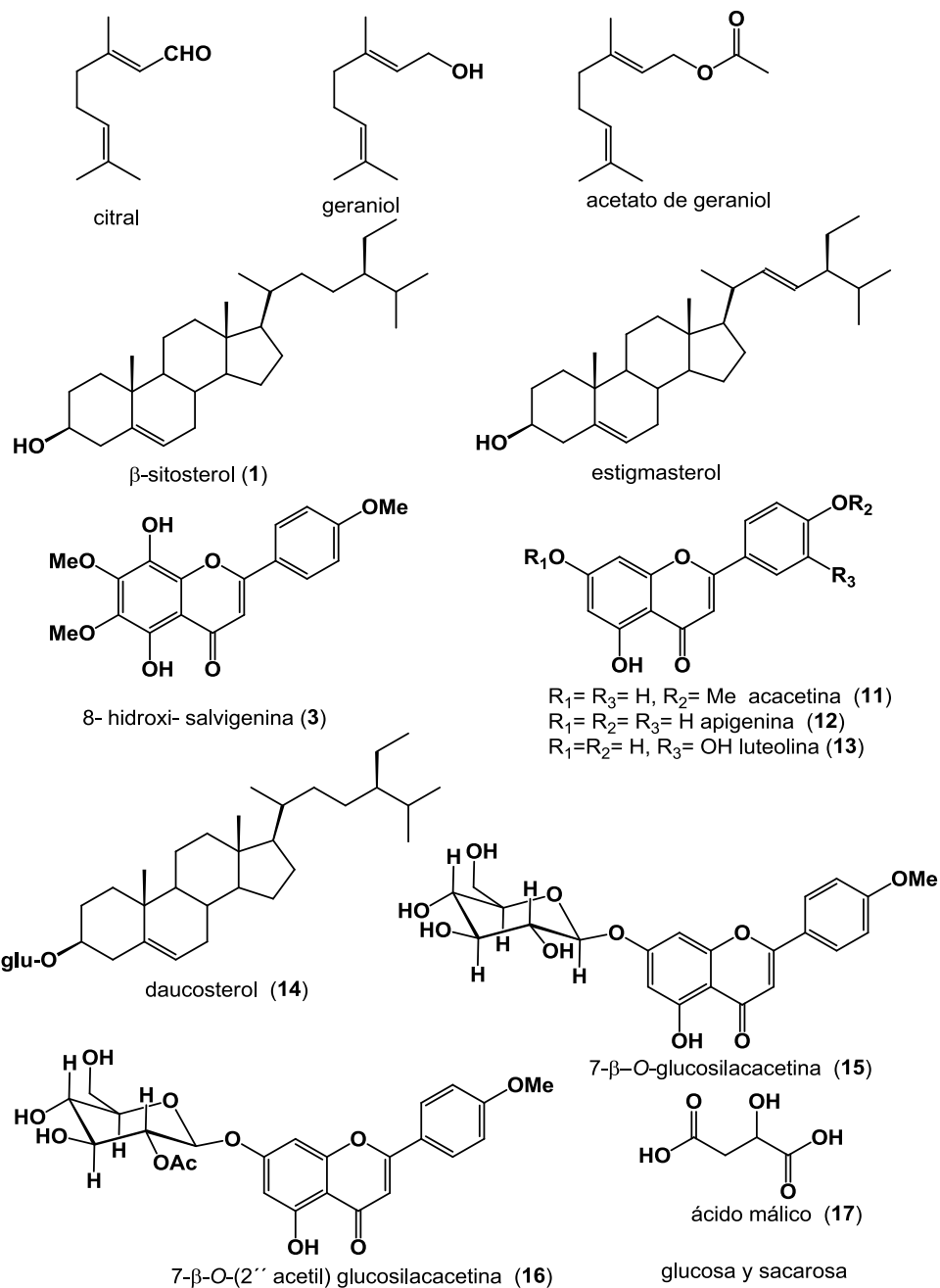
De acuerdo con los resultados del análisis de DM por medio de la técnica CLAR-EM, los componentes principales de DM son los glucósidos de: la 7-O- $\beta$ -D-(6''-O-malonil) acetina, la 7-O- $\beta$ -D-(6''-O-malonil) luteolina y la 7-O- $\beta$ -D-(6''-O-malonil) apigenina, así como el 7-O- $\beta$ -D-glucurónido de la acetina, mientras que las flavonas acetina, 8-hidroxisalvigenina y diosmetina fueron detectadas solo en trazas. Por último, los monosacáridos maltosa, xilosa, glucosa y fructosa así como el ácido ferúlico también fueron detectados en el extracto acuoso.

En relación con el estudio químico de DM, la composición de los aceites esenciales fue similar a la informada para las colectas realizadas en Rusia y Asia mientras que, las principales diferencias con la colecta Mexicana es la ausencia de ácido rosmarínico, la baja concentración de apigenina así como la abundante cantidad de azúcares detectados. Es también importante la variedad de derivados de glucósidos de flavonoides que se encontraron en la especie estudiada.

Como se ha mencionado antes, se ha informado que algunos glucósidos de flavonoides producen efectos sedantes en ratones. Por ejemplo, esta descrito que la administración vía i.p. de los glicósidos de los flavonoides: linarina, 2S-hesperidina, 2S-neohesperidina, 2S-naringenina, diosmina, gossipina y rutina produce efectos sedantes SNC en ratones evaluados en la prueba del tablero con perforaciones y en la prueba del tiempo de sueño inducido por pentobarbital, estos flavonoides también indujeron un decremento en la actividad locomotora de los animales experimentales. En base a estos antecedentes, la presencia en DM de la 7-O- $\beta$ -D-(6''-O-malonil) glucosilacacetina, la 7-O- $\beta$ -D-(6''-O-malonil) glucosil-luteolina y la 7-O- $\beta$ -D-(6''-O-malonil) apigenina, así como el 7-O- $\beta$ -D-glucurónido de la acetina, podría explicar los efectos sedantes producidos por *D. moldavica*. Cabe mencionar, que en la especie estudiada la apigenina solo fue detectada en trazas. Sin embargo, es importante resaltar la abundante presencia de los derivados glicosilados de apigenina como de luteolina, los 7-O- $\beta$ -D-(6''-O-malonil) glucosil apigenina y la 7-O- $\beta$ -D-(6''-O-malonil) glucosil luteolina, Además, se ha descrito el efecto sedante de luteolina (Fernández *et al.*, 2004).

En la Figura 4 se muestran los principales metabolitos secundarios aislados e identificados en los extractos orgánicos de *Dracocephalum moldavica*.

**Figura 4** Metabolitos secundarios de los extractos orgánicos de *Dracocephalum moldavica*.



En conclusión, estos resultados indican que a las dosis probadas, DM produce efectos sedantes, disminuye la actividad ambulatoria y produce relajación muscular en animales de experimentación. DM no mostró efectos de tipo ansiolítico ni antidepresivo en los paradigmas en los que fue evaluado. Tomados en conjunto estos datos indican que el extracto acuoso produjo una inhibición general de la actividad neuronal del SNC.

Es factible suponer que los glicósidos de flavona presentes en el extracto activo contribuyen a los efectos sedantes producidos por *Dracocephalum moldavica*. Sin embargo, estudios posteriores deben llevarse a cabo para evaluar esta posibilidad. Los resultados de esta investigación fueron publicados en el artículo que se muestra a continuación (Martínez-Vázquez *et al.*, 2012).

***Agastache mexicana* subespecie *mexicana* y *Agastache mexicana* subespecie *xolocotziana*.**

**Rosa Estrada-Reyes, C. López-Rubalcava, Octavio Alberto Ferreyra-Cruz Ana María Dorantes-Barrón, G. Heinze, Julia Moreno Aguilar, Mariano Martínez-Vázquez.** 2014. Central nervous system effects and chemical composition of two subspecies of *Agastache mexicana*; an ethnomedicine of Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 153, 98-110.

Dos subespecies de *Agastache mexicana* se utilizan en forma de té o infusión, como un remedio herbolario para la curación del "susto", como tranquilizante y/o sedante así como para inducir el sueño. Estas plantas

medicinales son hoy en día unas de las más vendidas en el centro de México (FAO, 2012). Sin embargo, hasta antes del presente estudio no se contaba con informes que confirmaran los efectos atribuidos a estas especies

En base a estudios botánicos, taxonómicos y morfológicos previos se propuso la existencia de dos subespecies de *A. mexicana* (la subespecie *mexicana* y la *xolocotziana*), con base en el estudio químico de ambas plantas realizado por nuestro grupo de trabajo, en el cual demostramos que existen notables diferencias en los metabolitos secundarios que expresan cada una de estas subespecies (Estrada-Reyes, *et al.*, 2004).

Teniendo esto en cuenta, se decidió evaluar los efectos sobre el SNC producidos, de los extractos acuosos de las partes aéreas tanto de *A. mexicana* subespecie *mexicana* (Amm) como de la *A. mexicana* subespecie *xolocotziana* (Amx) en varios modelos de conducta en ratones.

En cuanto a las evaluaciones farmacológicas, se utilizaron las pruebas de conducta exploratoria en un ambiente aversivo y la prueba de conducta de enterramiento defensivo (López-Rubalcava *et al.*, 2006) para detectar posibles efectos de tipo ansiolítico. En el primer paradigma, un aumento en la conducta de exploración (número de transiciones entre los compartimientos iluminado y oscuro) es considerado o un efecto de tipo ansiolítico, mientras que una disminución de dicha conducta es considerada como un efecto inespecífico o de tipo ansiogénico (Viola *et al.*, 1995; Estrada-Reyes *et al.*, 2010). Nuestros resultados indicaron que a dosis bajas de Amm y Amx indujeron efectos de tipo ansiolítico en ratones, aumentando significativamente el número de transiciones entre los compartimientos iluminado y oscuro. Estos efectos fueron similares a los inducidos por la administración de dosis bajas de DZ (0.25- 0.5

mg/kg). Así mismo, tanto Amm, Amx y DZ aumentaron el tiempo que los ratones permanecieron en el área iluminada durante la prueba. Un aumento de este parámetro también denota acciones de tipo ansiolítico. Amm fue más potente que Amx, ya que a dosis más bajas de Amm (0,01 a 10,0 mg/kg) indujo su efecto ansiolítico en comparación con Amx (1,0 a 10 mg/kg). Por otro lado, cuando los ratones fueron administrados con dosis mayores de Amm (100 mg/kg), Amx (100 mg/kg) o diazepam (4.0 mg/k) se observó un aumento significativo el tiempo que los ratones permanecieron el compartimento obscuro, lo cual, en esta prueba es considerado como un efecto inespecífico.

Los resultados obtenidos en la prueba de la conducta de enterramiento mostraron que Amm y Amx (0.01 y 10 mg/kg), así como el diazepam (0.5 a 2 mg/kg) disminuyeron la conducta de enterramiento, un efecto considerado ansiolítico (López-Rubalcava *et al.*, 2006). Sin embargo, sería importante tener en cuenta que en el modelo la conducta de enterramiento, pueden ocurrir falsos positivos si los animales son incapaces de enterrar la terminal electrificada debido a la falta de coordinación motora. Teniendo en cuenta que tanto Amm y Amx a dosis altas (100 mg/kg) produjeron incoordinación motora en la prueba del rodillo rotatorio, así como un aumento en la latencia de enterramiento observado en la prueba de enterramiento (parámetro que indica la capacidad de los animales para reaccionar cuando se enfrentan a un estímulo aversivo). Entonces, es posible decir que a dosis por arriba de los 10 mg/kg Amm y Amx, producen efectos sedantes más que de tipo ansiolítico. Esta idea está apoyada por los resultados obtenidos en la prueba del tablero con perforaciones. En este caso, Amm y Amx (100 mg/kg) disminuyeron la

conducta exploratoria de los ratones, inclusive Amm produjo un mayor efecto que Amx.

Como se mencionó con anterioridad, el modelo del tablero con perforaciones ofrece un método simple para medir la respuesta de los roedores a un entorno desconocido que puede detectar tanto efectos ansiolíticos como sedantes. Por lo que los resultados obtenidos en este modelo animal, confirmaron los efectos sedantes de Amm y Amx. Estos resultados apoyan la idea de que Amm y Amx a dosis mayores de 10 mg/kg producen una inhibición de la actividad sobre el SNC, que se refleja como una acción sedante, mientras que sus acciones ansiolíticas se observan a dosis menores.

En cuanto al análisis químico de los extractos acuoso de ambas subespecies, el análisis por CLAR-EM indicó la presencia la presencia de trazas de las flavonas agliconas: diosmetina, gardenina A y 8OH-salvigenina. Mientras que, el 7-O- $\beta$ -glucósido de acacetina fue detectado como el producto principal en ambos de extractos (24,49 % en Amm y 22,42 % en Amx). De manera similar, también se detectó su correspondiente derivado esterificado del ácido málico, pero se observó una diferencia importante en términos de concentración entre las dos subespecies (Amm= 31,47 %, Amx= 2,1 %).

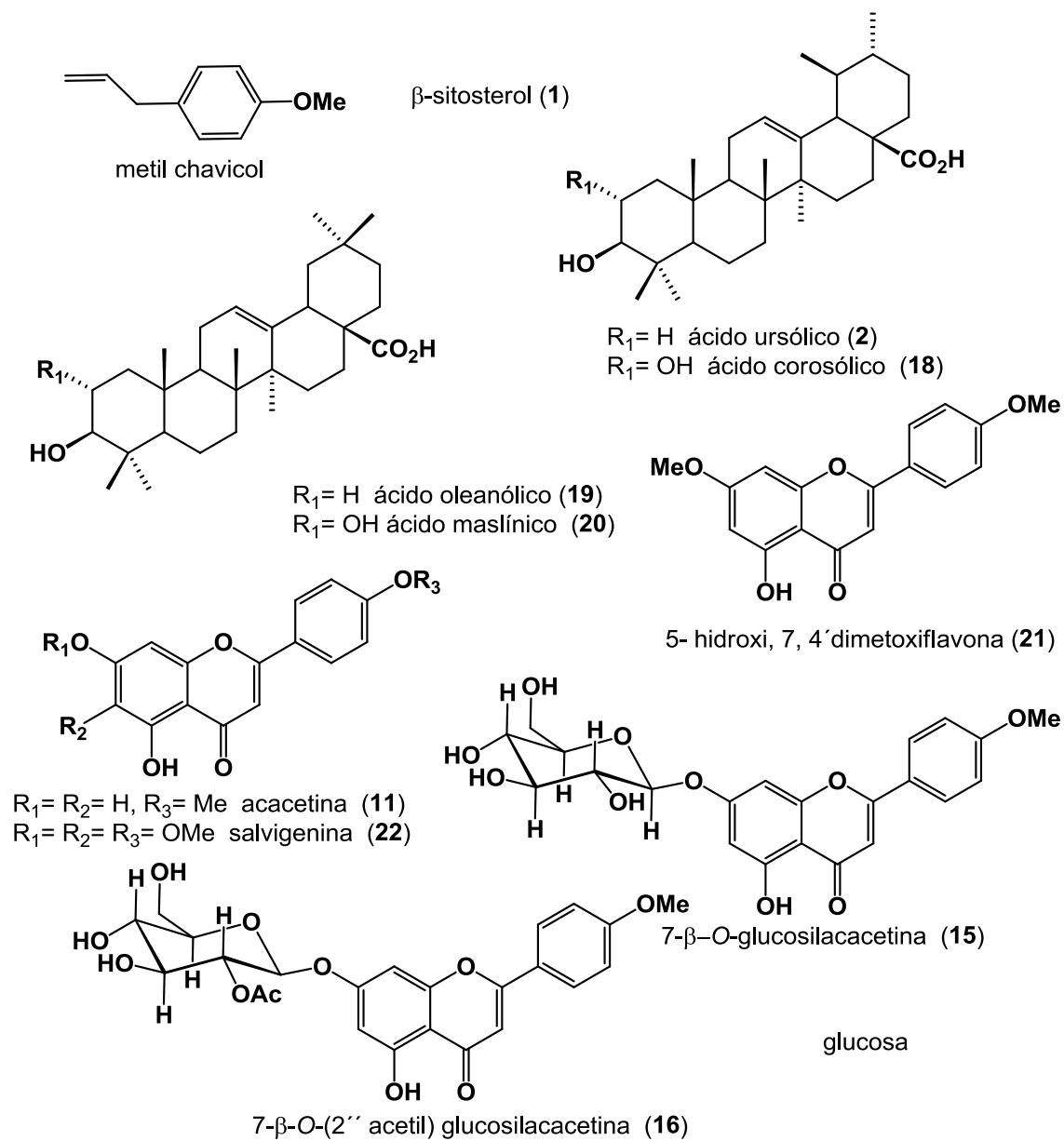
El ácido málico también se aisló por precipitación del extracto acuoso a partir de la sub-especie *mexicana* y este se detectó en el análisis por CLAR-EM. Estos últimos resultados, junto con las concentraciones de azúcares en Amm podrían explicar la alta concentración de derivados glicosilados del ácido málico observada en Amm y no en Amx. Adicionalmente, cabe destacar que a partir del extracto de hexano de *A. mexicana* subespecie *xolocotziana* se aisló



por primera vez en esta especie, la flavona pilosina, una 8OH-flavona y el triterpeno  $\beta$ -amirina.

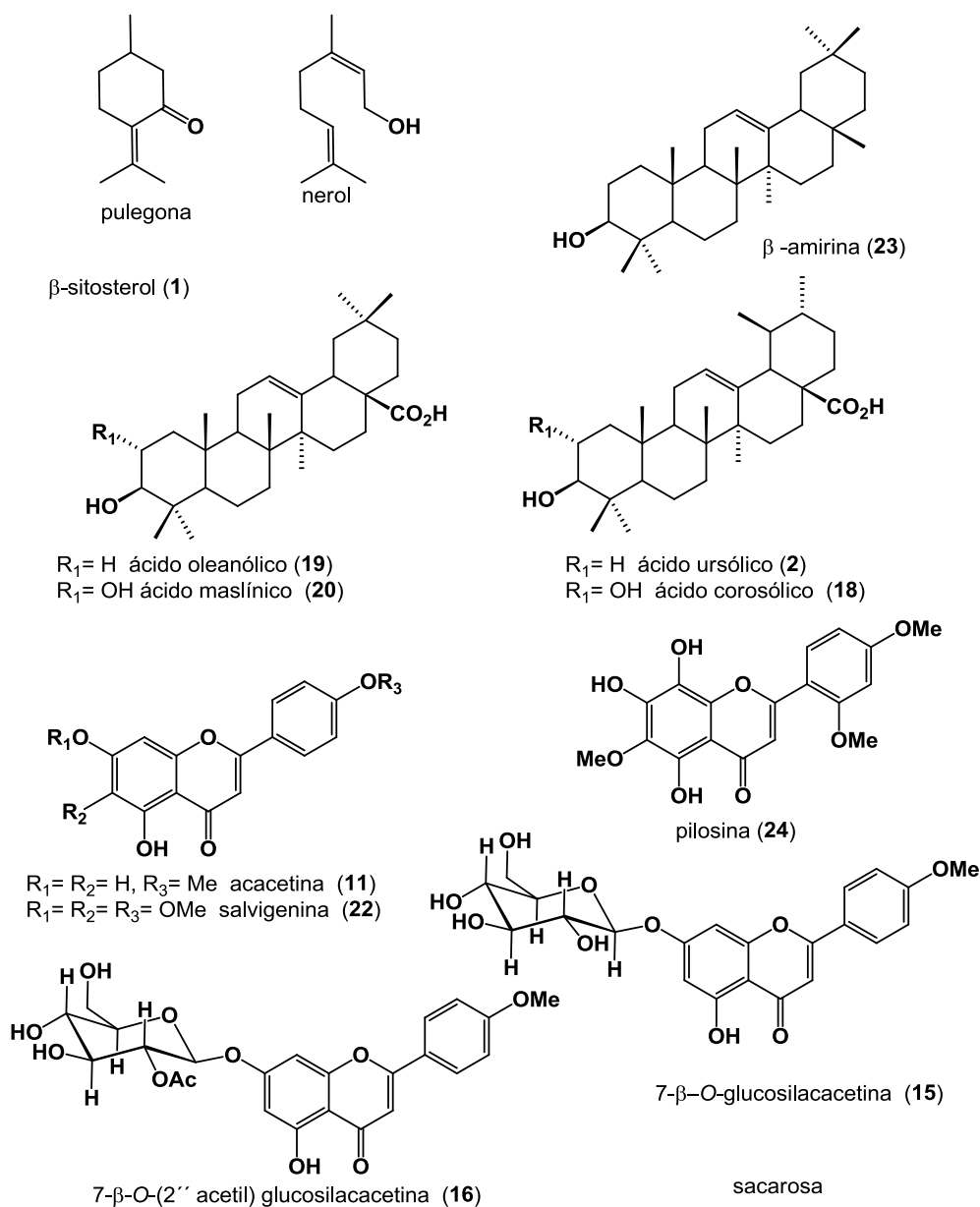
Otra diferencia notable entre Amm y Amx es la abundancia de polifenoles y flavonoides totales; Amm contiene una mayor concentración de polifenoles y flavonoides en comparación con Amx esto es probablemente debido a la intensa coloración azul-rojo de la subespecie *mexicana*. En la Figura 5 se muestran los principales metabolitos secundarios aislados e identificados en los extractos orgánicos de *A. mexicana* subespecie *mexicana*.

**Figura 5.** Metabolitos secundarios mayoritarios aislados de los extractos orgánicos de *A. mexicana* subespecie *mexicana*.



En la figura 6 se representan los principales metabolitos secundarios aislados e identificados en *A. mexicana* subespecie *xolocotziana*.

**Figura 6.** Metabolitos secundarios mayoritarios aislados de los extractos orgánicos de *A. mexicana* subespecie *xolocotziana*.



Teniendo en cuenta que Amm y Amx tienen derivados de flavonoides, se podría sugerir que estos compuestos participan tanto en la inducción de sus efectos ansiolíticos como sedantes.

De forma similar, a las especies descritas anteriormente, es factible sugerir que los compuestos de tipo flavonoide, a través de su interacción con el sistema

GABAérgico, sean los responsables de las acciones ansiolíticas y sedantes de estas especies.

Sin embargo, no podemos descartar la participación de otros sistemas de neurotransmisión en las acciones de estas especies, tales como los serotoninérgico y/u opioides, entre otros. Por otro lado, los modelos de nado forzado (FST) y de suspensión de la cola (TST) son los modelos animales útiles para la investigación de nuevos fármacos antidepresivos (Porsolt *et al.*, 1977, Porsolt *et al.*, 1977a; Martínez-Vázquez *et al.*, 2012; Steru *et al.*, 1985). La TST induce un estrés moderado, útil para predecir los estados de ánimo, por el contrario la FST induce un estrés mayor que el inducido con la TST.

Los resultados mostraron que la administración por vía oral de una dosis única de Amm indujo un aumento estadísticamente significativo en el tiempo de inmovilidad en ambas pruebas, de una manera opuesta al efecto inducido por DIM, un antidepresivo de uso clínico. Mientras que la administración de Amx no produjo cambios significativos con respecto al grupo control en el modelo de nado forzado ni en el modelo de la suspensión de cola, únicamente a 200 mg/kg produjo un aumento en el tiempo de inmovilidad.

Con el fin de aportar información sobre los posibles efectos tóxicos y riesgos para la salud producidos por el consumo de estas dos especies de *Agastache*, fueron evaluaron sus efectos sobre la actividad ambulatoria y la coordinación motora en las pruebas de campo abierto, Rota-rod, la rejilla invertida, mientras que su toxicidad aguda se determinó mediante el cálculo de la DL<sub>50</sub>.

La coordinación motora es un comportamiento complejo y puede reflejar el equilibrio, la fuerza muscular y la marcha. La pérdida de la coordinación

motora es una característica común de deterioro neurológico y es un efecto secundario potencial de ciertos compuestos como los barbitúricos y fármacos sedantes, tales como benzodiazepinas o alcohol y es uno de los efectos más fácilmente observables (Nwinyi y Kwanashie, 2009).

Nuestros resultados mostraron que los tratamientos con Amm o Amx producen incoordinación motora a dosis altas (100 a 200 mg/kg), observado como una disminución en el tiempo en que los animales son capaces de mantenerse en el rodillo giratorio, estos efectos fueron similares a los producidos por DZ a la dosis de 4 mg/kg.

Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos en la prueba de la rejilla invertida (Mylvaganam *et al.*, 1999), en la que los animales tratados con Amm mostraron una debilidad muscular notable a partir de la dosis de 100 a 1000 mg/kg, que se vio reflejada por una disminución significativa en el tiempo de sujeción.

Adicionalmente, los ratones tratados con Amx a Amm a 100 mg/kg mostraron una disminución significativa en la actividad ambulatoria en la prueba de campo abierto. Con base en estos resultados, podemos concluir que Amm y Amx, a partir de 100 mg/kg producen además de sus efectos sedantes una disminución en la coordinación motora y la fuerza muscular de los sujetos experimentales. En la mayoría de los casos, Los efectos sedantes producidos por Amm se presentaron con una mayor potencia en comparación con Amx.

La toxicidad aguda que resulta de la administración oral de ambos extractos Amm y Amx se midió según el método de Lorke. A dosis de 1,0 a 100 mg/kg Amm no produce efectos adversos, mientras que en dosis de 2600 mg/kg se observaron algunos efectos, tales como la diarrea, ataxia y erupción

cutánea, sin embargo, estos efectos desaparecen en el transcurso de la primera hora posterior a la administración. La  $DL_{50}$  Amm fue mayor a 5000 kg/mg, de acuerdo con el método empleado, el extracto es considerado no tóxico. Además, la administración oral de Amx (1 a 100 mg/kg) produjo diarrea y diaforesis que desaparecieron en el transcurso de la primera hora posterior a la administración. A la dosis de 5000 mg/kg indujo algunas manifestaciones tóxicas que persistieron hasta la muerte de todos los sujetos experimentales. De acuerdo con el método de Lorke, la  $LD_{50}$  es de 3807mg/kg, y el extracto ser considerado como ligeramente tóxico. Estos resultados indican que Amm tiene un índice mayor de seguridad que Amx. Estos resultados también sugieren que el consumo de estas especies no implica riesgos significativos para la salud. Sin embargo, vale la pena para llevar a cabo estudios sobre los posibles efectos tóxicos producidos por el consumo crónico de estas plantas medicinales.

En resumen hemos encontrado que los extractos acuosos de las subespecies; *mexicana* y *xolocotziana*, a dosis bajas (0.01 a 10 mg/kg) indujeron acciones de tipo ansiolítico; mientras que a dosis más altas, mayores de 100 mg/kg, indujeron efectos sedantes afectando la actividad ambulatoria y la coordinación motora. Estos resultados indican que Amm y Amx pueden causar una inhibición general de la actividad neuronal. Curiosamente, el extracto acuoso de *A. mexicana* subespecie *mexicana* parece ser más potente que la *A. mexicana* subespecie *xolocotziana*, teniendo en cuenta que a dosis más bajas, Amm induce acciones del tipo ansiolítico y que sus efectos sedantes son más potentes que los producidos por Amx. Además la baja

toxicidad implica que el consumo de estas subespecies de *Agastache* no implica riesgo significativo para la salud.

Tomados en conjunto, estos resultados apoyan el uso de *A. mexicana* subespecie *mexicana* y *A. mexicana* subespecie *xolocotziana* en la medicina tradicional como agentes ansiolíticos, tranquilizante y sedantes.

### ***Relación de los efectos sobre el SNC y la presencia de glicósidos de flavonoides en los “toronjiles”***

*El estudio de los efectos farmacológicos de estas cuatro plantas medicinales*

Evidencio dos hechos:

1. Todos los extractos acuosos mostraron efectos sedantes; además, los extractos de *A. mexicana* subsp *mexicana* y *A. mexicana* subsp *xolocotziana* a dosis bajas indujeron efectos ansiolíticos.
2. En todos los extractos acuosos activos se verificó presencia de glicósidos de flavonoides y sus derivados en forma de ésteres del ácido málico.

Con evidencia de los resultados obtenidos, se puede postular que los glicósidos de flavonoide presentes en los extractos acuosos de los toronjiles estudiados contribuyen a sus efectos ansiolíticos, sedantes y antinociceptivos. En la Tabla 1 se muestra la relación entre los efectos farmacológicos y la presencia de metabolitos secundarios de glicósidos de flavonoide en las cuatro especies estudiadas.

**Tabla 1** Efectos farmacológicos y metabolitos secundarios mayoritarios de las cuatro especies estudiadas.

Espece	Compuesto mayoritarios	Efecto
<b><i>Clinopodium mexicanum</i></b>	neoponcirina poncirina isonaringina	sedante
<b><i>Dracocephalum moldavica</i></b>	7-O-β-D-(6''-O-malonil) glucosil acacetina, 7-O-β-D-(6''-O-malonil) glucosil luteolina, 7-O-β-D-(6''-O-malonil) glucosil apigenina	sedante
<b><i>Agastache mexicana</i></b>		
<b>subsp <i>mexicana</i></b>	7-O-β-glucosil acacetina 7-O-β-D-(6''-O-malonil) glucosil acacetina	ansiolítico/sedante
<b>subsp <i>xolocotziana</i></b>	7-O-β-glucosil acacetina 7-O-β-D-(6''-O-malonil) glucosil acacetina	ansiolítico/sedante

En los últimos años la investigación para encontrar la relación entre los efectos sobre el SNC, sus mecanismos de acción y sus características estructurales de los flavonoides ha sido intensa.

Así, se ha descrito que flavonoides glicosilados, como; la linarina (7-O-rutinósido de acacetina), 2S-hesperidina (7-O-rutinósido 1→2 de hesperetina), 2S-neohesperidina (7-O-rutinósido 1→6 de neohesperetina), 2S-naringenina (7-O-glucósido de naringenina), diosmina (7-O-rutinósido de diosmetina), y rutina (3-O-rutinosido de quercetina) ejercen efectos depresores del SNC en ratones, también se ha documentado ampliamente que estos efectos son principalmente consecuencia de su interacción con el sistema GABAérgico (\*\*).

Por otro lado, la amplia distribución de GABA endógeno, junto con el hecho de que prácticamente todas las neuronas son sensibles a su efecto inhibitor, indica que la función de GABA es ubicua en el cerebro. Los estudios



han demostrado también que el GABA es un transmisor en aproximadamente el 30 % de todas las sinapsis en el SNC. Por lo tanto, no es sorprendente pensar, que las acciones depresoras del SNC observados con la administración de extractos ricos en flavonoide pueden deberse a su acción sobre este sistema de neurotransmisión. De acuerdo con esta observación y los resultados de esta investigación, la presencia de glucósidos de flavonoides y sus derivados esterificados, podrían explicar los efectos depresores, ansiolíticos y sedantes producidos por los toronjiles.

Por otro lado, cabe mencionar que en este trabajo se identificó por primera vez la presencia de los ésteres del ácido málico de glucosil apigenina y glucosil acacetina en los extractos acuosos *A. mexicana* subespecies *mexicana* y *xolocotziana* y *D. moldavica*; los 7-O- $\beta$ -D-(6''-O-malonil) glucosil apigenina y 7-O- $\beta$ -D-(6''-O-malonil) glucosil acacetina, este último también fue aislado del extracto metanólico de *A. mexicana* subespecie *mexicana*.

A este respecto, las investigaciones sobre la biosíntesis de flavonoides en cultivos celulares han sugerido que malonilación puede ser la etapa final en la formación de estos constituyentes glicosilados en la planta. Esto es debido a que las acciones de la enzima maloniltransferasa tienen la función de esterificar, para hacer más solubles en agua a los compuestos glicosilados, permitiendo de esta forma su almacenamiento en las vacuolas de las plantas que los producen. Sin embargo, la presencia de los derivados glicosilados del ácido málico en extractos polares han sido poco descritos, posiblemente debido a que estos ésteres lábiles son generalmente pasados por alto debido a los procedimientos de detección o aislamiento inadecuados que causan su degradación.

En cuanto a la participación de estos derivados esterificados en los efectos depresores de las dos especies de *Agastache* y *D. moldavica*, es factible que estos sean precursores de 7-O- $\beta$ - glucosil apigenina y 7-O- $\beta$ - glucosil acacetina, que como consecuencia de un proceso hidrólisis por el metabolismo del primer paso, estos sean liberados para ser entonces absorbidos y continuar con su proceso de acción y metabolismo como se discutirá más adelante.

### **(2S)-Neoponcirina**

J. Cassani, A.G. Escalona Araujo, M. Martínez-Vázquez, G. Heinze, J. Moreno, and R. Estrada-Reyes. 2013. Anxiolytic-like and antinociceptive effects of 2S - Neoponcirin in mice. *Molecules*, 18, 7584-7599.

Con el fin de apoyar la hipótesis de los flavonoides como los principios activos de los toronjiles, se evaluaron los efectos sobre el SNC del rutinósido de flavanona, 2(S)-neoponcirina (NEO), la cual es uno de los principales metabolitos secundarios de tipo flavonoide aislado a partir de *Clinopodium mexicanum*.

La Neoponcirina se aisló a partir de una mezcla compleja obtenida del extracto de MeOH de *C. mexicanum*, como un sólido amorfo de color blanco, punto de fusión= 256-258 °C, con una fórmula molecular de C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>O<sub>14</sub> determinada por espectrometría de masas (positivo ESI-EM m/z 595 (M+H) y  $[\alpha]_D^{25} = -45^\circ$ . El espectro de <sup>13</sup>C-RMN mostró señales de 28 átomos de carbono, uno de ellos metoxilo, un grupo metilo, dos metilenos, diecisiete

metinos y siete carbonos cuaternarios, que fueron asignados mediante experimentos DEPT, HSQC y HMBC. El espectro de protón mostró un conjunto de señales de un sistema AA'BB' en  $\delta = 7.45$  y  $6.98$  ppm que corresponde a los protones H-2', 6' y H-3', 5' del anillo B. La asignación fue confirmada por la señales en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  128 para el C-2'/C-6' y 113 para C-3'/C-5', otra señales características mostraron la presencia de protones en posición meta a  $\delta = 6.12$  ppm y estos fueron asignados a H-6 y H-8 del anillo A, respectivamente. Correspondiente en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  a C-6 en 96.5 y C-8 a 95.5 ppm. Estas observaciones sugirieron que las posiciones C-5 y C-7 estuvieran oxigenadas, la sustitución de C-5 fue confirmada por la presencia de una doble señal a 4.98 ppm en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  cuya constante de acoplamiento ( $J = 7,5$  Hz) corresponde a un protón de una glucosa en la posición  $\beta$ . La señal más notable es la que muestra la interacción entre el H-2 y H-3 (ax) con una constante de acoplamiento de  $J_{(2,3)} = 12.6$  Hz que indica que la configuración de C-2 del grupo arilo heterocíclico anillo es ecuatorial, lo que implica que la molécula tiene una configuración 2S. Los datos espectrales en su conjunto establecieron la estructura de este compuesto como (2S)-5-hidroxi-7-O- $\beta$ -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -ramnósido, 4'methoxyflavanona.

El efecto antinociceptivo de NEO fue evaluado en el modelo de nocicepción térmica de la platina caliente. Los resultados mostraron que, de manera similar al ibuprofeno (IB), el cual prolongo la latencia de la respuesta al estímulo nociceptivo respecto al grupo control, la administración i.p. de NEO a dosis de 1, 10, 20 y 40 mg/kg produjo un aumento estadísticamente significativo en la latencia de respuesta, que muestra un mejor efecto a los 30 min después de administración i.p.

Estos resultados mostraron que NEO ejerce un efecto antinociceptivo ante el estímulo térmico dependiente de la dosis, este efecto fue mejor que el producido por IB, un potente analgésico no opioide (AINE) que es eficaz en el ensayo de la platina caliente. Por lo tanto, cuando se comparan las actividades de NEO e IB, se puede observar que NEO es claramente más potente que IB. Asimismo, los efectos antinociceptivos producidos por NEO no están asociados con ningún efecto adverso ya que estas dosis no modificaron la actividad ambulatoria de los animales de experimentación. Sólo a las dosis de 40 mg/kg NEO produjo una disminución en la actividad ambulatoria de los ratones, lo que podría interferir con su efecto anti nociceptivo. Los resultados mostraron que el NEO es un principio activo de *C. mexicanum*, y pone de relieve su potencial farmacológico para el desarrollo de nuevos analgésicos.

La administración de NEO no produjo cambios en la latencia ni la sedación ni el tiempo de sueño, en la prueba de tiempo de sueño inducido por pentobarbital sódico. Estos resultados indican que NEO no induce efectos sedantes en ninguna de las dosis probadas. Como se mencionó, el pentobarbital aumenta alostéricamente la neurotransmisión GABAérgica incrementando el tiempo medio de apertura del canal de una manera dependiente de GABA, por lo que, es posible que NEO no sea capaz de modificar este mecanismo.

Cuando se evaluaron NEO y diazepam (DZ) este modelo, tanto NEO (1 a 10 mg/kg) como DZ (0,5 mg/kg) a dosis bajas mostraron actividad de tipo ansiolítica. De forma similar tanto NEO como DZ produjeron efectos sedantes a dosis mayores. De este modo, NEO mostró un perfil farmacológico bifásico

similar al de diazepam, en el que a dosis pequeñas causa efectos ansiolíticos, mientras que a dosis mayores produce efectos sedantes.

Estos hechos sugieren que el sistema GABAérgico podría estar implicado en los efectos ansiolíticos producido por NEO. Las BDZ son moduladores positivos de la neurotransmisión GABAérgica, es decir que se requiere la presencia de GABA para producir las acciones ansiolíticas de las benzodiazepinas, mientras que, los agonistas GABAérgicos tales como muscimol interactúan directamente con el sitio de unión de GABA para activar la conductancia de ion cloruro y por lo tanto funcionan incluso en ausencia de GABA. Por el contrario los agentes que inhiben la neurotransmisión GABAérgica son ansiogénicos, por ejemplo, la picrotoxina es un antagonista de los receptores GABA y produce, en ratones, efectos de tipo ansiogénicos. La picrotoxina es un antagonista, no competitivo selectivo de GABA que bloquea específicamente el receptor GABA<sub>A</sub> evitando de este modo el efecto de inhibición del GABA neuronal.

Basado en la hipótesis de que el sistema GABAérgico está involucrado en las acciones ansiolíticas de NEO, se evaluó la coadministración de picrotoxina (PTX) y muscimol (MUS) en combinación con NEO

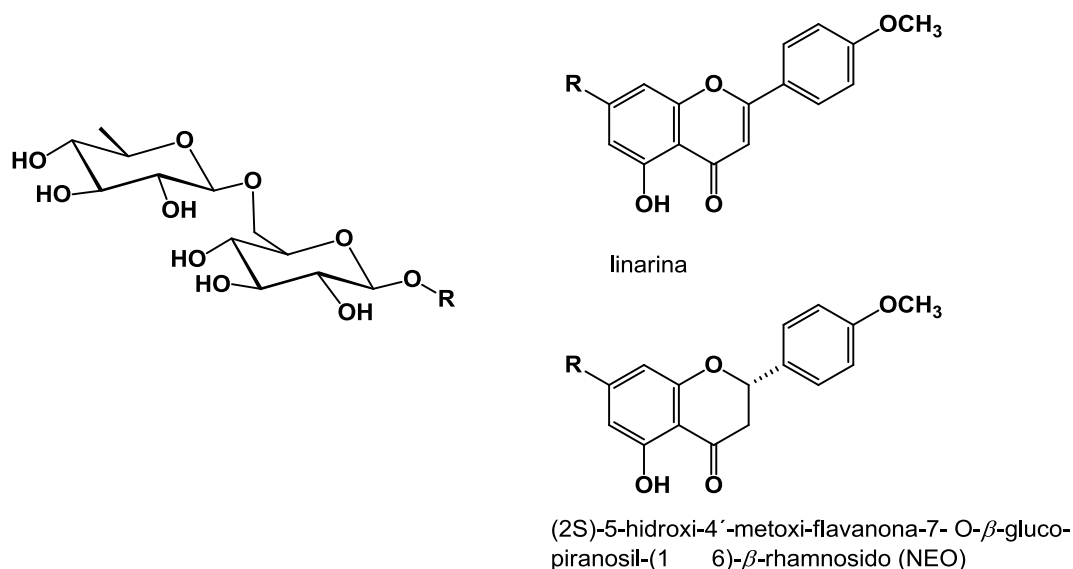
Los resultados indicaron que, como signos de actividad ansiolítica, NEO a la dosis de 10 mg/kg aumentó significativamente las conductas de exploración de los ratones (número de paradas y asomadas) con respecto al grupo control en la prueba del tablero con perforaciones. Por otro lado, cuando se administraron simultáneamente NEO y picrotoxina a 0.5mg/kg, éste a fue capaz de bloquear completamente el efecto ansiolítico de NEO. Estos hallazgos sugieren que NEO induce su efecto ansiolítico a través de la

activación del sistema GABAérgico, específicamente, a través de su unión a nivel pos sináptico en los receptores GABA<sub>A</sub>. Esta idea se confirmó, cuando la coadministración de NEO (1mg/kg) y muscimol ambos a dosis no efectivas, produjo un efecto de tipo ansiolítico, similar al producido por NEO a 10 mg/kg en el modelo del tablero con perforaciones. La combinación de muscimol y NEO resulto ser más potente que cada uno de los fármacos por separado. Estos resultados apoyan la propuesta de que NEO podría unirse directamente en el sitio del GABA, otra probabilidad es que NEO produzca cambios alostéricos en los receptores GABA<sub>A</sub> de forma similar a DZ, o simplemente de forma similar al muscimol, sea un agonista del GABA. Sin embargo, es necesario llevar a cabo experimentos más específicos dirigidos a responder estas posibilidades.

Podemos afirmar que los resultados obtenidos, son un buen índice de la participación en el sistema GABAérgico en las acciones ansiolíticas de NEO. Aunque no podemos descartar la participación otros sistemas de neurotransmisores, tales como la serotonérgico, dopaminérgico, noradrenérgico, sistemas metabotrópicos del receptor GABA<sub>B</sub> o el sistema opioide que podrían contribuir a la efectos de tipo ansiolítico así como en los efectos antinociceptivos de NEO. Por ejemplo, se acepta que el sistema de opioides juega un papel en las acciones de las benzodiazepinas ansiolíticas y que también modulan las conductas afectivas. Varios estudios han demostrado que los antagonistas de opioides, tales como naloxona puede bloquear las respuestas a las benzodiazepinas ansiolíticas. Por otra parte, se ha informado que la gossipina un glucósido de flavonol activa los receptores de opioides.

Por otro lado, el centro estereogénico C-2 de NEO parece ser importante para la acción ansiolítica, ya que como se muestra en la figura siguiente, la linarina, un ramnósido de acetina Figura 7, cuya única diferencia estructural que tiene con NEO es la presencia de una doble ligadura en C-2/C-3, induce efectos sedantes pero no ansiolíticos (Fernández *et al.*, 2004).

**Figura 7** Diferencias estructurales entre linarina y 2S-neoponcirina



### ***Metabolismo de glicósidos de flavonoides y su acción biológica en humanos***

Nuestras evaluaciones farmacológicas se realizaron principalmente mediante la administración vía intraperitoneal a los animales de prueba, no obstante en la medicina tradicional la principal vía de administración es la oral. Esto plantea el problema de conocer, sí la vía de administración altera las estructuras de los principios activos durante el proceso de absorción y por consiguiente su acción terapéutica.

Los estudios sobre el metabolismo de los flavonoides en humanos son escasos. Es conocido que las moléculas de los azúcares de los glicósidos de flavonoides, por lo general son escindidos en los procesos de absorción. Posteriormente, los flavonoides son generalmente conjugados con moléculas que aumenten su polaridad, principalmente con el ácido glucurónico, aumentando así su velocidad de excreción. Este proceso se lleva a cabo en el hígado y en menor medida en el riñón. Las moléculas conjugadas entonces se excretan en la bilis y la orina (Estrada-Reyes *et al.*, 2013).

Otra vía metabólica es la fisión o descomposición de estas moléculas en el colon, produciendo principalmente ácidos fenólicos que pueden ser absorbidos, conjugados y a continuación, excretados en la bilis y en la orina.

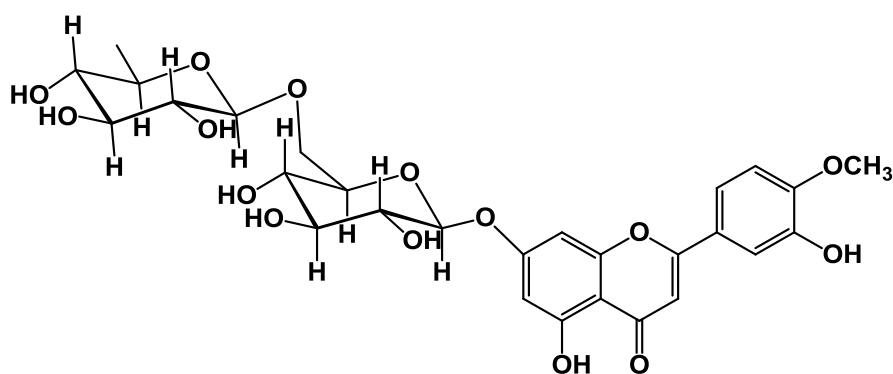
Por ejemplo, en la ingesta de la rutina, un glicósido de quercetina, se detectaron los siguientes ácidos en sangre y orina: 3-hidroxifenilacético, 3,4-dihidroxi fenilacético y 3-metoxi-4-hidroxifenilacético (ácido homovalínico) así como el 3,4-dihidroxitolueno pero no se detectaron ni la rutina ni su aglicona de la quercetina (Peterson y Dwyer, 1998).

Las evaluaciones farmacocinéticas de la diosmina, un glicósido de flavona, se realizaron después de una administración oral a voluntarios sanos. La diosmina y su aglicona, diosmetina se determinaron por CLAR y técnicas de CLAR-EM. Los resultados indicaron solamente la presencia de la diosmetina, la aglicona de la diosmina, pero no se detectó el glicósido original. Este resultado indica que en el proceso de absorción se escindió el residuo disacárido de la molécula original. El análisis de los parámetros farmacocinéticos, indicaron que la diosmetina presentó una prolongada vida media plasmática de entre 26 y 43 horas. Los datos mostraron la ausencia total de eliminación urinaria de la



diosmina (Figura 8) y su aglicona la diosmetina, mientras que sus metabolitos menores se eliminaron en la orina, principalmente como conjugados de ácido glucurónico. La presencia de productos de degradación tales como los ácidos alquil-fenólicos confirma un patrón metabólico similar al de otros flavonoides (Cova *et al.*, 1992).

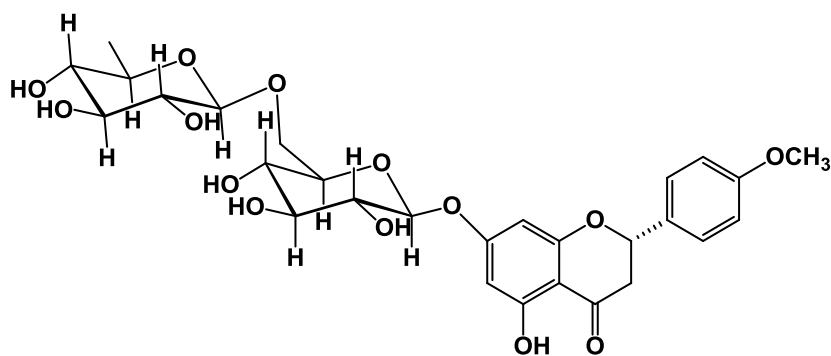
**Figura 8** Estructura del rutinósido de flavona, diosmina



diosmina

En otro estudio la poncirina se aisló a partir de extracto acuoso de los frutos de *Poncirus trifoliata* y fue metabolizada *in situ* por bacterias intestinales humanas. Se investigó el efecto inhibitorio de la poncirina (Figura 9) así como los metabolitos producido por las bacterias intestinales en el crecimiento de *Helicobacter pylori*. Los resultados indicaron que el principal metabolito de la ponciretina (5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavanona o ponciretina), fue el inhibidor más potente del crecimiento de *H. pylori* con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 10-20 mg/mL. Sin embargo, la poncirina y sus metabolitos, excepto ponciretina, no inhibieron el crecimiento de *H. pylori*, ni la actividad de la enzima *H. pylori* ureasa (Dong-Hyung *et al.*, 1999).

**Figura 9** Estructura del rutinósido de flavanona, poncirina



poncirina

Tomando en cuenta estos resultados se puede postular que los glicósidos de flavonoides presentes en las especies estudiadas son hidrolizados liberando las agliconas correspondientes.

Con el fin de aportar datos sobre la posible actividad sedante o ansiolítica de las agliconas provenientes del metabolismo de los glicósidos presentes en los toronjiles, se discutirán los datos publicados para la apigenina.

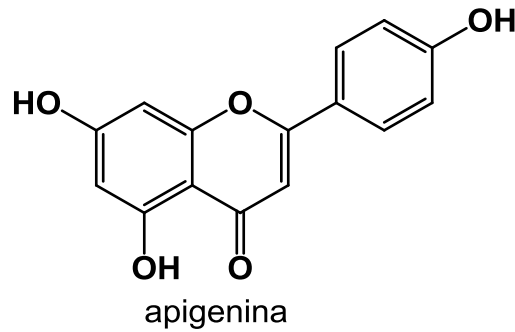
Los datos actuales parecen indicar que, en contraste con los resultados informados previamente, la apigenina (Figura 10) no ejerce efectos de tipo ansiolítico. Así mismo se ha propuesto que el efecto sedante de la apigenina no es solo mediado por los receptores a BDZ, esta propuesta se basa tomando en cuenta los siguientes hechos:

- a) la afinidad de apigenina para estos receptores es muy bajo;
- b) apigenina disminuyó el efecto inducido por GABA, lo que sugiere un efecto ansiogénico y no ansiolítico.
- c) el efecto sedante de la apigenina no se bloqueó por antagonistas específicos a BDZ.

Como consecuencia, la actividad sedante de apigenina no puede ser atribuido a una activación directa de los receptores GABAérgicos y este efecto

sería mejor caracterizado mediante el estudio de su interacción con sistemas de neurotransmisión diferentes a este (Avallone *et al.*, 2000).

**Figura 10** Estructura de la flavona aglicona, apigenina



Tomando en cuenta los resultados anteriores, en un estudio posterior se demostró que la apigenina presentó un efecto antagonista sobre los receptores del GABA y NMDA. Sin embargo, la inhibición sobre los receptores GABAérgicos no pueden explicar los efectos de esta flavona *in vivo* no obstante se demostró que el canal de NMDA es uno de los blancos de acción de la apigenina (Losi *et al.*, 2004).

**Acción de algunos glicósidos de flavonoides sobre el SNC**

Los datos anteriores indican que los mecanismos de la actividad sobre el SNC de los flavonoides libres, principalmente flavonas y flavanonas, no están elucidados del todo, quedando varias incógnitas por resolver. Sin embargo, está claro es la baja absorción de estos compuestos por vía oral y sus transformaciones principalmente a ácidos fenólicos, con lo que sus probables acciones terapéuticas se reducen.

Por otro lado, se conoce que algunos glicósidos de flavonoides, administrados por vía intraperitoneal, como la 2S-neohesperidina, la 2S-naringina, la diosmina, la rutina y la gossipina, aumentaron el tiempo de sueño inducido por pentobarbital en ratones. También produjeron una reducción de las conductas exploratorias y la actividad ambulatoria, cuando fueron evaluados en los modelos del tablero con perforaciones y campo abierto respectivamente. Estos resultados indican que todos los glicósidos evaluados causaron una inhibición general de la actividad neuronal (Fernández *et al.*, 2006).

Los glicósidos de flavonoides son compuestos de origen vegetal que no son endógenos en los seres humanos. A pesar de su presencia generalizada en nuestra dieta común, su acción sedante es indetectable. Este hecho puede ser explicado tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

Se estima que la ingesta dietética de los flavonoides puede llegar de 1 a 2 g/día, pero el número y la naturaleza de los compuestos ingeridos son diferentes y todas las estimaciones disponibles en la actualidad son incompletas. El hecho es que una dieta normal, sin incluir infusiones de

hierbas, no parece proporcionar suficiente cantidad de flavonoides para manifestar efectos sobre el SNC (Estrada-Reyes et al., 2012).

El mecanismo del metabolismo de los flavonoides de la dieta en los seres humanos es todavía un asunto que no se conoce muy bien. Se supone que inicialmente sufren la escisión del residuo de azúcar para ser absorbidos como sus agliconas. Pequeñas cantidades de las agliconas también pueden estar presentes. Se conoce que, salvo la diosmetina, las agliconas restantes no presentan acción sedante por lo que su liberación a partir de los glicósidos correspondientes no contribuiría al efecto biológico.

Las propiedades de la hesperidina se han explorado ya en etapas clínicas y condiciones experimentales. Sin embargo, su actividad sobre el SNC ha sido difícil de evaluar y reproducir. Este fallo puede explicarse en parte por el hecho de que el compuesto generalmente utilizado fue la mezcla racémica proporcionada por el industria de los cítricos, sin embargo se conoce que el compuesto activo es el isómero (-) 2S de la hesperidina (Marder *et al.*, 2003).

Como se mencionó antes, se ha demostrado que varios derivados de flavona actúan *in vitro* como ligando de los receptores de GABA<sub>A</sub>, uniéndose al sitio de las BDZ, produciendo un potencial de acción de inhibición, con los consecuentes efectos sedantes en ratones. En contraste, varios glicósidos de flavonoides no pueden modificar la unión del [<sup>3</sup>H] flunitrazepam a la membrana de la corteza sinaptosomal del cerebro de la rata (Wang *et al.*, 2002).

De acuerdo con estudios previos esta falta de afinidad de los glicósidos de flavonoides por el sitio de flumazenil puede ser se explicada por la presencia de un residuo de azúcar de gran tamaño molecular así como por el núcleo

flavanona y un grupo catecol en los carbonos C3' y C4' cuando está presente. (Marder *et al.*, 1996, 1997, 2001).

Experimentos electrofisiológicos con derivados de flavonas y flavanonas han demostrado que algunos de ellos pueden modular corrientes de cloruro generados por GABA, ya sea positiva o negativamente. Por el contrario, estudios previos realizados con glicósidos de flavonoides muestran que estos compuestos no pueden directamente activar los receptores GABA<sub>A</sub> o modular las corrientes cloruro inducida por GABA en los receptores subtipos GABA<sub>A</sub>  $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$  expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*.

El estado funcional de una amplia población de subtipos de receptores GABA<sub>A</sub>, presentes en preparaciones de membrana de la corteza, fueron evaluados mediante la medición de la cantidad de [<sup>3</sup>H]-terbutil-biciclo-ortobenzoato ([<sup>3</sup>H]-TBOB), PTZ un fármaco pro-convulsivo con afinidad a este receptor. Los resultados mostraron que los glicósidos flavonoides no modifican la unión de [<sup>3</sup>H]-TBOB a los receptores en las membranas sinaptosomales del cerebro de rata asociadas con los receptores GABA<sub>A</sub> (Fernández *et al.*, 2006)

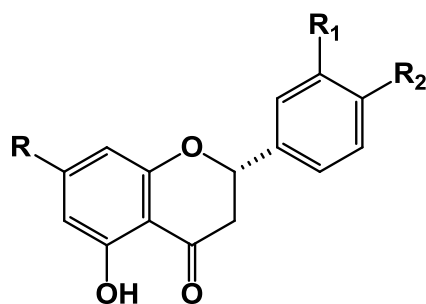
Por otro lado, dado que los glicósidos de flavonoides son fácilmente metabolizados por el organismo, por lo que existe la posibilidad de que algunos de sus metabolitos puedan activar los receptores GABAérgicos y producir efectos sedantes. Sin embargo, los efectos sedantes de la 2S-hesperidina *in vivo* no fueron bloqueados por picrotoxina, un antagonista no competitivo del GABA.

Estos resultados en su conjunto, sugieren que las acciones depresoras del SNC producidas por los glicósidos flavonoides no implican a los clásicos receptores GABA<sub>A</sub>, al menos no directamente.

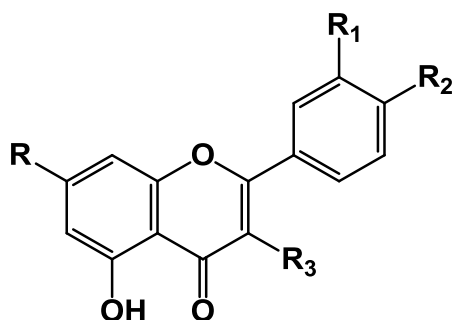
Teniendo en cuenta, tanto los efectos sedantes y de tipo ansiolítico de algunos glicósidos de flavonoides cuando fueron administrados vía intraperitoneal se puede postular el siguiente orden de actividad:

2S-hesperidina>linarina>rutina>diosmina\2S-neohesperidina>gossipina $\cong$ 2S-naringina (Figura 11).

**Figura 11** Estructura de algunos glicósidos de flavonoide con actividad sedante y/o ansiolítica



R= 7-O- <i>b</i> -glucosa-6-ramnosa, R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OMe	2S-hesperidina
R=7-O- <i>b</i> -glu-2-ramnosa, R <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> =OMe	2S-neohesperidina
R=7-O- <i>b</i> -glu-2-ramnosa, R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> =OH	2S-naringina



R= 7-O- $\beta$ -glucosa-6-ramnosa, R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OMe, R <sub>3</sub> =H	linarina
R=R <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> =OMe, R <sub>3</sub> =O- <i>b</i> -glucosa-6-ramnosa	rutina
R=O- $\beta$ -glu-6-ramnosa, R <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> =OMe, R <sub>3</sub> =H	diosmina

A pesar de que no hay suficiente información para establecer una completa correlación entre la estructura y la actividad ansiolítica y sedante, algunas conclusiones parciales son evidentes.

1. La presencia de residuos de monosacáridos es importante para preservar la acción y de acuerdo con la secuencia obtenida, la relación entre residuos de azúcar es importante. Por ejemplo, los glucósidos más activos tienen una unión 1→6 entre ramnosa y glucosa.
2. Cuando esta unión es 1→2, como en 2S-neohesperidina, se observó una disminución notable en la actividad. Por otro lado,
3. la posición 7 en el núcleo del flavonoide para el residuo del azúcar es la más efectiva.

En cuanto a la porción benzo-γ-pirona de la molécula,

4. la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, lo que resulta en derivados de flavona con configuración plana, como la linarina, no parece ser crítico para la actividad.
5. La hidroxilación y metoxilación del núcleo benzo-γ-pirona podría ser esencial para la actividad, sin embargo los efectos de los cambios en el patrón de sustitución no han podido establecerse con claridad.

Estos resultados indican claramente que los glicósidos de flavonoides afectan el SNC de los roedores, por lo general, cuando se administran de manera intraperitoneal.

Tomando en cuenta estos hallazgos y conociendo que los extractos acuosos de *Clinopodium mexicanum*, *Agastache mexicana* subespecie *mexicana*, *Agastache mexicana* subespecie *xolocotziana* y *Dracocephalum moldavica* presentaron efectos ansiolíticos y sedantes en ratones y todos contiene glicósidos de flavonoides entonces es factible suponer que estos compuestos son, al menos en parte, responsables de estos efectos.



# *Conclusiones*

- Una sola administración del extracto acuoso de las partes aéreas de *Clinopodium mexicanum* induce efectos depresores del SNC, así como efectos sedante y anti-nociceptivos en ratones, estos resultados apoyan el uso popular de *C. mexicanum* como un remedio para inducir el sueño y como tranquilizante.
- Los glicósidos de flavanona presentes en el extracto de *C. mexicanum* contribuyen a los efectos producidos por esta especie, mediante su interacción con el sistema de inhibición GABAérgico.
- Esta propuesta que se vio apoyada por los resultados obtenidos en la evaluación de la flavanona 2(S)-neoponcirina, la cual indujo efectos antinociceptivo y de tipo ansiolítico en ratones. Además el efecto de tipo ansiolítico producido por 2(S)-neoponcirina, fue bloqueado por la coadministración con picrotoxina, mientras que su coadministración con muscimol produjo un efecto sinérgico. Confirmando así, la participación del sistema GABAérgico en el efecto ansiolítico producido por 2(S)-neoponcirina.
- El extracto acuoso de *Dracocephalum moldavica*, produjo un efecto sedante en ratones, además de tener un alto contenido en metabolitos secundarios de tipo flavonoide en forma libre como glicosilados.
- Las dos subespecies de *A. mexicana*, (*mexicana* y *xolocotziana*) produjeron efectos de tipo ansiolítico a dosis bajas y efectos sedantes a dosis mayores. Ambos extractos tuvieron un alto contenido de flavonoides y flavonoides glicosilados, así como sus correspondientes derivados esterificados del ácido málico

Los estudios químicos de cuatro plantas medicinales enmarcados en la medicina tradicional como “toronjiles” y recomendados como remedios para el “susto”, los “nervios”, el “espanto” y otros padecimientos o síndromes de filiación, indicaron la presencia constante de compuestos flavonoides en los extractos con propiedades antinociceptivas, sedantes y ansiolíticas.

El presente trabajo demuestra la importancia de las plantas medicinales como una alternativa para el tratamiento de los trastornos mentales como la ansiedad y la depresión, y como paliativo del dolor, pone en evidencia su importancia como fuente de obtención de nuevas moléculas con actividad sobre el SNC y su potencial en la generación de nuevos fármacos con mejores propiedades terapéuticas y menores efectos adversos. Así como, para la obtención de moléculas útiles en la experimentación y modelado de las bases biológicas que subyacen a algunos trastornos mentales.

# *Referencias*

- Aguilar CA., Camacho JR., Chino S., Jácquez P., López ME, 1994. Plantas medicinales del Herbario IMSS. Cuadros básicos por aparatos y sistemas del cuerpo humano. IMSS (Edit.) México, D.F. p.218.
- Almaguer, J.A., Vargas Vite, V., García Ramirez, H.J., Ruiz Belman, A. 1997. Manual: *Diagnostico de Salud de los Pueblos Indígena*, IMSS Solidaridad, INI y SSA, documento mecanoescrito.
- Avallone, R., Zanolì, P., Puia,G., Kleinschnitz, M., Schreier, P., Baraldi, M. 2000. Pharmacological Profile of Apigenin, a Flavonoid Isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochemical Pharmacology*. 59, 1387–1394.
- Barberan, FAT, 1986. The flavonoid compounds from Labiate. *Fitoterapia* 57, 67-95.
- Barberan, FAT., Gil MI., 1992. Chemistry and Natural Distribution of Flavonoids in the Labiate. In: Harley, RM., Reynolds, T., (Eds), *Advance in Labiate Science*. Royal Botanic Gardens, Kew, p 299-305.
- Base de datos NAPRALET. Program of Collaborative Reseaerch in the Pharmaceutical Sciences. Chicago: college of Pharmacy, University of Illinois.
- Bataille E, Chausset R. Bases Neurophysiologiques. *Soins* 1997: 6-8.
- Bouton ME, Mineka S, Barlow DH. A modern's leraning theory on the etiology of panic disorder *Psychological Review* 2001; 108(1): 4-32
- Bye R., Linares, E., Ramamoorthy, TP., Gracia, F., Collera O., Palomino G., Corona V., 1987. *Aggastache mexicana* subs. *xolocotziana* (Lamiaceae). A new taxón from mexican medicnal plants. *Phytologia* 62, 156-163.
- Campos Navarro, R. 1997, *La antropología médica en México*, 2 tomos, Instituto Mora/UAM, México.

- Chen, S. Huang, X. Zeng, X. J. Sieghart W., Tietz E. I. 1999 Benzodiazepine-mediated regulation of  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1-3$  and  $\gamma 2$  gabaa receptor subunit proteins in the rat brain hippocampus and cortex Neuroscience. 93 (1),33–44.
- Cassani, J. ,Escalona Araujo, A.G. Martínez-Vázquez, M. Heinze, G., Estrada-Reyes R. Anxiolytic-like and antinociceptive effects of neoponcirin in mice; isolation and chemical characterization.
- Collado, R.A, Rubel, A.J., O’Nell, C., Murray, R.H. 1983. A folk illness (susto) as an indicator of real illness. The Lancet, 322 (2), 1362.
- Cova, D., De Angelis, L., Giavarini, F., Palladini, G., Perego, R. 1992. International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology, 30(1), 29-33.
- Dastmalchi K, Dorman H J D, Kosar M, Hiltunen R. 2007. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. Lebens Wissen un Technol. 40, 239–248.
- Das, P. 2003. The GABAA receptor antagonist picrotoxin inhibits 5-hydroxytryptamine type 3A receptors. Neuropharmacology, 44, 431–438.
- DALYs por sus siglas en Inglés; Disability-Adjusted Life Year (DALY) OMS 2001b.
- Olsen, R.W., Walmsley, J.K., Lee, R.J., Lomas, P. 1986. Benzodiazepine/Barbiturate/GABA receptor-chloride ionophore complex in a genetic model for generalized epilepsy. Adv Neurol, 44, 365-378.
- De la Cruz, M., 1991. *Libellus de medicinalibus indorum herbis*: manuscrito Azteca de 1552, según traducción latina de Juan Badiano. Segunda

- edición, Fondo de Cultura Económica: Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico, D.F., México.
- Diccionario Enciclopédico de la medicina tradicional mexicana. Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana. 2009. Pérdida del alma. Consulted: [2/11/2013]. Disponible en: ([www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/termino.php?1=1&=pérdida del alma](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/termino.php?1=1&=pérdida del alma)).
- Dong-Hyun, K., Eun-Ah, B., Myung Joo, H., 1999. Anti-Helicobacter pylori Activity of the Metabolites of Poncirin from Poncirus trifoliata by Human Intestinal Bacteria Biological & Pharmaceutical Bulletin. 22, 422-424.
- Duke J.A., Bogenschultz-Godwin, M.J., Du Cellier, J, Duke, P.A.K. 2002. Handbook of medicinal herbs CRC Press: Boca Raton , Fl.,
- Estado de la información forestal en México, 2012. Comisión Europea de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Santiago de Chile.
- Estrada-Reyes, Rosa, Aguirre Hernández, Eva, García-Argáez, Aída, Soto Hernández, Marcos, Linares, Edelmira, Bye, Robert, Heinze, Gerardo and Martínez-Vázquez, Mariano. 2004. Comparative Chemical Composition of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*. Biochemical Systematics and Ecology, 32, 685-694.
- Estrada-Reyes, R., López-Rubalcava, C., Rocha, L., Heinze G., González Esquinca, A.R., Martínez-Vázquez, M. 2010. Anxiolytic-like and sedative actions of *Rollinia mucosa*; possible involvement of the

- GABA/benzodiazepine receptor complex. *Pharmaceutical Biology* 48, (1), 70-75, 2010.
- Estrada-Reyes, R., Martínez-Vázquez, M., Gallegos-Solís, A., Heinze, G., and Moreno J. Depressant Effects of *Clinopodium mexicanum* Benth. Govaerts (Lamiaceae) on the Central Nervous System. *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 1-8, 2010.
- Estrada-Reyes, R., Ubaldo-Suárez, D.y Araujo-Escalona, A.G. 2012. Los flavonoides u el Sistema Nervioso Central. *Salud Mental*, 35 (5).
- Estrada-Reyes,R., López-Rubalcava, C., Ferreyra-Cruz, O.A., Dorantes-Barrón, A.M., Heinze, G., Moreno Aguilar, J., Martínez-Vázquez, M. 2014. Central nervous system effects and chemical composition of two subspecies of *Agastache mexicana*; an ethnomedicine of Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 153, 98-110.
- Extra-farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, Secretaria de Salud. 2001. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Secretaria de Salud, México, D.F., México, p 24.
- FAO Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Estado de la información forestal en México, 2012).
- Fagetti, Antonella (comp.) 2003. *Los que saben. Testimonios de vida de los médicos tradicionales de la región de Tehuacán*, ISCyH-BUAP/Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas, México.
- Fernández, S., Wasowski, C., Paladini, A. C., Marder, M. 2004. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from



- Valeriana officinalis. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 77, 399–404.
- Fernández, S., Wasowski, C., Loscalzo M.L., Granger, E.R., Graham, A.R., Paladini C.A., Marder, M. 2006. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides Sebastián P., *European Journal of Pharmacology* 539, 168–176
- File, S.E. Testing new antianxiety agents: pharmacology and biochemistry. En: *The Neurobiology of Anxiety* (Burrows, G.D., Roth, S.M. y Noyes, R. Eds.), pp 141-164. Elsevier, Ámsterdam, 1990.
- Foster CA. y Kemp JA. 2006 Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Current Opinions in Pharmacology*, 6:7-17.
- García Rivas, H., 2000. *Enciclopedia de plantas medicinales Mexicanas* Ed. Posada. México, D.F., Mexico, p. 67.
- Haefely, W., Kulcsar, A., Moler, H., Pieri, L., Polc, P. y Schaffner, R. 1975. Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines. En: *Mechanism of actions of benzodiazepines* (Costa, E. y Greengard, P. Eds), pp 131-151. Raven Press, Nueva York.
- Haefely, W. 1989. Pharmacology of the Benzodiazepines Receptors. *Eur Arch. Psychiat. Neurol. Sci.* 238, 294-301.
- Haefely, W. 1990. The GABA-benzodiazepine receptor complex and anxiety. En: *Anxiety Psychological, Biological and Clinical Perspectives*. Sartorius N., Andreoli V., Cassano G., Eisenberg L., Kielholz P., Pancheri P. y Racagni G. Ed. Hemisphere Publishing Corporation, pp23-26, New York.

- Handbook of Medicinal Herbs. In: Ltd. CP, ed. Boca Raton, Florida, US, 562-4.
- Harbone JB and Williams CA.,1998 Anthocyanins and other flavonoids. Nat. Prod Rep.15, 631.
- Harbone JB, Baxter J., Eds. 1999. The Handbook of Natural Flavonoids, vol. 1 John Wiley and Sons, Chichester, Section3.
- Harley, R.M. y Granda, P., 2000. List species of tropical *American Clinopodium* (Labiatae), with new combinations. Kew Bulletin 4, 917-927.
- Hommer DW, Skolnick P, Paul SM. The Benzodiazepine/GABA receptor complex and anxiety. En: Meltzer HY, ed. Psychopharmacology: The Third Generation of Progress. New York: Raven Press; 1987. p. 977-83.
- IESM-OMS informe sobre sistema de salud mental en México Informe de la evaluación del sistema de salud mental en México utilizando el Instrumento de Evaluación para Sistemas de Salud Mental de la Organización Mundial de la Salud (IESM-OMS) MÉXICO 2011.
- Informe sobre la salud en el mundo 2001a. Salud mental: Nuevos conocimientos, nuevas esperanzas. Capítulo 2.
- Jarogniew J. 2005. Isobolographic characterisation of interactions among selected newer antiepileptic drugs in the mouse pentylenetetrazole-induced seizure model. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol 372:41-54
- Kaplan, Sadock's: Comprehensive Textbook of Psychiatry Lippincott Williams & Wilkins, 2002. 8. Rodríguez-Landa JF, Contreras CM.

- Kotsos, Maria, P.; Aligiannis, Nektarios; Mitakou, Sofia, 2007. A new flavonoid diglycoside and triterpenoids from *Stachys spinosa* L. Lamiaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 35(6): 381-385.
- La salud mental en México, Servicio de Investigación y análisis, División de Política Social, 2005. Publicación de la Secretaria de Salud, Ciudad de México, México, jul. 9, 2009.
- Linares, E., Flores, B., Bye, R., 1995. Plantas medicinales de México: Usos y remedios tradicionales, 2nd ed. Centro de Tecnología Electrónica e Informática (CETEI) y el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IB-UNAM), México.
- Linares ME., Flores, BP., Bye R., 1998. Selección de plantas medicinales de México., Limusa y Editorial Noriega, México, D.F., p 125.
- Linares, E., Flores, B., Bye, R., 1999. Plantas Medicinales de México, usos y remedios tradicionales. Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM, México, DF, México. pp 195.
- López-Rubalcava, C., Piña-Medina, B., Estrada-Reyes, R., Heinze, G., & Martínez-Vázquez, M. 2006. Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimolia* in two anxiety paradigms: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life sciences*,78(7), 730-737.
- Lorke, D., 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology* 54, 275-287.
- Losi, G., Puia,G., Garzon,G., de Vuono, M. C. Baraldi M. 2004. *European Journal of Pharmacology*. 502, 41-46]

- Marder, M., Viola, H., Wasowski, C., Fernández, S., Medina, J. H., Paladini, A.C., 2003. 6-Methylapigenin and hesperidin: new *valeriana* flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 75, 537-545.
- Manual Diagnostico y Estadístico de los Trastornos Mentales IV. American Psychiatric Association. Ed. Masson, S.A. Barcelona, España, 1997.
- Medina-Mora, M.E., Borges, G., Benjet, C., Lara, C., Berglund, P., 2007. Psychiatric disorders in Mexico: lifetime prevalence in a nationally representative sample. *The British Journal of Psychiatry* 190 (6): 521–528.
- Manual Diagnostico y Estadístico de los Trastornos Mentales, DSM V, mayo del 2013.
- Martínez-Vázquez, M., Estrada-Reyes, R., Martínez-Laurrabaquio, M, López-Rubalcava, C., y Heinze G. 2012. Neuropharmacological study of *Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae) in mice: Sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract. *Journal Ethnopharmacology*, 141, 908-917.*
- Merskey, H., Bogduk N. 1994. Classification of chronic pain. (eds). IASP Press, Seattle, 210.
- Millan, M. J. 2003. The neurobiology and control of anxious states. *Progress in neurobiology*, 70(2), 83-244.
- Mylvaganam, J., Butters, T.D., Cortina-Borja, M., Hunnam, V., Perry, V.H., Dwek, R.A., Platt, F.M. 1999. Delayed symptom onset and increased life expectancy in Sandhoff disease mice treated with N-butyldeoxynojirimycin. *Proc.Natl. Acad. Sci.* 96 (11), 6388-6393.

- Molina-Hernández, M., Téllez-Alcántara, P., Martínez, E., 2000. *Agastache mexicana* may produce anxiogenic-like actions in the male rat. *Phytomedicine* 7, 199-203.
- Murdock, G. P. 1980. *Theories of Illness: A World Survey*. Pittsburgh, PA: University of Pittsburgh Press.
- Newland, C. F.; Cull-Candy, S. G. 1992. On the mechanism of action of picrotoxin on GABA receptor channels in dissociated sympathetic neurones of the rat. *Journal of Physiology* 447 (1), 191–213.
- Olsen, W.R., Sieghart, W. 2008. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of  $\gamma$ -Aminobutyric acid A receptors: Classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacological Reviews*. 60, 243-260.
- Najaafi, M., Ghasemian, E., Fathiazad, F., Garjani, A. 2009. Effects of total extract of *Dracocephalum moldavica* on ischemia/reperfusion induced arrhythmias and infarct size in the isolated rat heart. *Iran J Basic Med. Sci*, 11, 229-235.
- Nicholson AN, Pascoe PA. Dopaminergic transmission and the sleep-wakefulness continuum in man. *Neuropharmacol* 1990; 4:411-7. 17.
- Nwinyi, F.C., Kwanashie, H.O. 2009. Neuropharmacological effects of Sorghum bicolor leaf base extract. *Res. Pharma. Biotechnol.* 1, 1-008.
- Petty F. *GABA and mood disorders: a brief review and hypothesis. J Affect Disord* 1995; 34:275-81.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 266, 730–732.

- Promoción de la salud mental; conceptos, evidencia emergente, práctica. Informe compendiado. Un informe de la Organización Mundial de la Salud, Departamento de Salud Mental y abuso de Sustancias en colaboración con la Fundación Victoriana para la Promoción de la Salud u la Universidad de Melbourne, OMS, Ginebra 2003.
- Ramamoorthy, T. P., Bye, R., Lot, A., y Fa, J. 1998. Diversidad biológica de México. Instituto de Biología. UNAM. México, D. F.
- Reyes, C.D., González, O.J.C. Mohar, B.A., Meneses, G.A. 2000. Epidemiología del dolor por cáncer Re v. Soc. Esp. Dolor 7: Supl. II, 11-17.
- Rodríguez-Landa, J. F. y Contreras, C. M. 1998. Algunos datos recientes sobre la fisiopatología de los trastornos por ansiedad. Rev. Biomed.; 9: 181-191.
- Romera, E., Perena, M.J., Perena, M.F., Rodrigo, M.D. 2000. Neurofisiología del dolor. Rev. Soc. Esp. Dolor 7: Supl. II, 11-17.
- Rzedowski J. 1993. Biological diversity of México: origins and distribution, Oxford University Press. New York.
- Santillan-Ramírez, M.A., López-Villafranco, M.E., Aguilar-Rodríguez, A., Aguilar-Contreras, A. 2008. Etnobotany leaf architecture, and vegetative anatomy of *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* and *A. mexicana*, ssp. *xolocotziana*. Revista Mexicana de Biodiversidad, 79, 513-524.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2010. Plantas medicinales de la Farmacia viviente del CEFOFOR: usos terapéuticos tradicionales y dosificación. Comisión Nacional Forestal, Coordinación

- General de Educación y Desarrollo Tecnológico, México, D.F., México, p72.
- Síndromes de filiación cultural. Conocimiento y práctica de los médicos tradicionales en cinco Hospitales Integrales con Medicina Tradicional del Estado de Puebla, Secretaría de Salud, Gobierno del Estado de Puebla, 2004.
- "Susto"                      Susto                      17                      March.                      2011  
[[www.rice.edu/projects/HispanicHealth/Courses/.../susto.html](http://www.rice.edu/projects/HispanicHealth/Courses/.../susto.html)].
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simo, P. 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*. 87, 367-370.
- Tietz El., Huang X., Chen S., Ferencak WF. 1999. Temporal and regional regulation of  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$  and  $\beta 3$ , but not  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  or  $\gamma 2$  GABA<sub>A</sub> receptor subunit messenger RNAs following one-week oral flurazepam administration. 91(1), 327–341.
- Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T. 1998. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *European Journal of Pharmacology*. 350, 1 (29), 21–29.
- Tietz El., Ted, H.C., Howard, C.R. 1989. Regional GABA/benzodiazepine receptor/chloride channel coupling after acute and chronic benzodiazepine treatment. 167, 11 57–65.
- Viola, H., Wasowski, C., Levi de Stein, M., Wolfman, C., Silveira, R., Dajas, F., Medina, J.H., Paladini, A. C., 1995. Apigenin, a component of *Matricaria reticulata* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Medica* 61, 213-216.

- Valant-Vetschera, M.K., Roitman, J.N., Wollenweber, E. 2003. Chemodiversity of exudate flavonoids in some members of the Lamiaceae *Biochemical Systematics and Ecology* 31 (2003) 1279–1289
- Villar, J. 2006. Cómo investigar en algo tan subjetivo como el dolor *Rev. Soc. Esp. Dolor* 4: 250-253; 2006.
- Wang, H., Hui, K.M., Chen, Y., Xu, S., Wong, J.T., Xue, H. 2002. Structure-activity relationships of flavonoids, isolated from *Scutellaria baicalensis*, binding to benzodiazepine site of GABA(A) receptor complex. *Planta Medica* 68 (12), 1059-1062.
- Will C., McClatchey, Gail, B. Mahady, Bradley C. Bennett, Laura Shiels, ics 123 (2009) 239–254  
Valentina Savo. Ethnobotany as a pharmacological research tool and recent developments in CNS-active natural products from ethnobotanical sources. *Pharmacology & Therapeutic*.
- Xiaoqiong Ma, Guangyi Liu, Shuang Wang, Zhong Chenc. 2007. Evaluation of sphingolipids changes in brain tissues of rats with pentylenetetrazol-induced kindled seizures using MALDI-TOF-MS. *Journal of Chromatography B*; 859 170-7.
- Zolla, C., del Bosque, S., Tascon, M. A., Mellado C. V., Maqueo C., 1998. *Medicina Tradicional y Enfermedad. El susto*, pp. 83-99. Centro Interamericano de Estudios de Seguridad Social. In: Serrano, A.T., Montoya, A.B.J., Jasso, S.P., Moreno, J.A., 2012. *La investigación Social en México*. Ed Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo, México, CP 42000, ISBN: 978-607-482-280-9.



# *Información complementaria*

## Estudio fitoquímico

### *Material vegetal*

Recolecta e identificación botánica de *Clinopodium mexicanum*, *Agastache mexicana* subespecie *mexicana* y subespecie *xolocotziana* y *Dracocephalum moldavica* (toronjil de monte, toronjil morado, toronjil blanco y toronjil azul, respectivamente).

**A.** *Clinopodium mexicanum* Benth. Govaerts, (Lamiaceae) MEXU No. 946030, fue colectada en Chilapa, estado de Guerrero, México. La especie fue autenticada por la Botánica M. R. García Peña y un ejemplar fue depositado en el Herbario del Instituto de Biología de la UNAM.

**B.** *Dracocephalum moldavica* L., MEXU No. 1122.

**C.** *Agastache mexicana* (H.B.K.) Lint *Agastache mexicana* subesp. & Epling subsp. *mexicana* Bye, Linares & Ramamurthy, MEXU No. 1120.

**D.** *Agatache mexicana* (H.B.K) Lint & Epling subsp. *xolocotziana* Bye, Linares, MEXU No.1121).

*Dracocephalum moldavica*, *Agastache mexicana* subesp. *mexicana* y *Agastache mexicana* subesp. *xolocotziana* fueron colectados periódicamente en el poblado de Tlacotitlán municipio de Ozumba en el Estado de México y fueron identificados por los botánico Robert Bye y Edelmira Linares del Herbario Nacional del Instituto de Biología, UNAM. Un ejemplar de cada especie fue depositado en el Herbario del Instituto de Biología de la UNAM.

### **Material y equipo**

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Para las cromatografías relámpago se utilizó sílica gel de malla 230-400 marca Aldrich y para las cromatografías al vacío se utilizó sílica gel para cromatografía en capa fina 60G-F<sub>254</sub>.

La pureza de los productos se determinó por cromatografía en placa fina (ccf) en cromatófolios Macherey-Nagel, usando como revelador una solución de sulfato cérico al 1 % en ácido sulfúrico 2N y por HPLC.

Los espectros de masas se determinaron en un espectrómetro de Masas JEOL JMS 105, mediante técnicas de impacto electrónico a 70 eV o por ionización química utilizando metano para producir los iones o por FAB<sup>+</sup>.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se determinaron en instrumentos: Varian Gemini 200 MHz ó Varian UNITY-300 MHz o en un equipo Bruker Avance III 400 MHz. Los desplazamientos químicos de los espectros de RMN <sup>1</sup>H se dan en ppm con respecto al TMS y los de RMN <sup>13</sup>C con respecto a CDCl<sub>3</sub> (77ppm). Las constantes de acoplamiento (J) se dan en Hz.

### **Obtención de los extractos acuosos**

La preparación de los extractos acuosos de los diferentes toronjiles se realizó agregando por cada 10 g de material vegetal 90 mL de agua hirviendo, la mezcla se mantuvo a ebullición durante 10 min al término de lo cual se dejó

que la mezcla alcanzara temperatura ambiente, se filtró y liofilizó a  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y 0.01 mBar en un equipo Telstar Cryodos.

### ***Caracterización química de los extractos acuosos.***

Con el fin de identificar los constituyentes de tipo flavonoide de los extractos acuosos se desarrolló un método analítico de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC) con un detector de fotoarreglo de diodos (PAD) acoplado un espectrometro de masas con una trampa de iones (CLAR -MS-TI), El análisis se realizó en un cromatógrafo marca Waters modelo 6000 equipado con una columna Synergi Polar-RP 150 x 2.0 mm, and ID= 4 $\mu\text{m}$ , con el detector PAD acoplado a un espectrómetro de masas con trampa de iones marca Bruker Esquire 6000. La fase móvil que resultó más eficiente fue una mezcla de acetonitrilo-agua (10:90, v/v a 0 min hasta 100 v/v a los 30 min), con una velocidad de flujo de 0.2 mL/min y volúmenes de inyección de 5  $\mu\text{L}$  de extracto en agua. Todos los análisis se realizaron a una temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a una longitud de onda de detección de 254 nm. Los espectros de masas fueron medidos en un rango de  $m/z = 100\text{-}1000$  uma, con un ciclo de escáner de 2 s. Las condiciones de la fuente de ESI fueron ajustadas con  $\text{N}_2$ , a una temperatura de capilaridad de  $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y el voltaje del equipo es de 40.0 Volts, a una presión de 30 psi. (Estrada-Reyes *et al.*, 2009 Lewinsohn y cols., 1986; Grayer y cols., 2001; Venturella y cols., 1961; Da-yong y cols., 2006; Chul y cols., 2007; Avula *et al.*, 2005).

### ***Obtención de los extractos orgánicos***

Las partes aéreas del material vegetal seco y molido se pusieron a macerar de forma sucesiva en hexano, acetato de etilo y finalmente en metanol

en una relación de 5 L de disolvente por cada 1000 g de material vegetal, los extractos se filtraron y los disolventes fueron eliminados por destilación a presión reducida, los extractos fueron trabajados de forma individual y separados en sus componentes, mediante cromatografía en columna al vacío, columna relámpago y cromatografía en capa fina preparativa, según el caso.

### Evaluación Farmacológica

Se utilizaron ratones machos adultos (6-8 semanas) de la cepa Swiss Webster de 20-30 g de peso. Alojados en cajas de polipropileno de 44 x 21 x 21 cm, en grupos de ocho, bajo ciclo invertido de luz-oscuridad (12 h/12 h) de manera artificial, en un cuarto con temperatura controlada (T= 20-21 °C). Todos los animales tuvieron libre acceso a agua y alimento (purina) durante los experimentos. Tanto los fármacos como los extractos se prepararon antes de cada experimento y se administraron vía intraperitoneal, en una relación de volumen de 10 mL por kilogramo de peso del animal.

El manejo de animales se realizó conforme a la norma oficial mexicana para el manejo y cuidado de animales (NIH publication # 85-23, revisada en 1985) y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), y contó la aprobación del comité de ética del INPRFM.

***Clinopodium mexicanum* Brent. Brinq “toronjil de monte”**

Extracto de hexano 365 g (3.65 %)

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (10/90) se obtuvo  $\beta$ -**sitosterol (1)**, (100 mg, 0.01%) como un sólido blanco cristalino, con pf= 130-132 °C (pf= 133-135 °C descrito, Matloubi, 2006).

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (20/80) se aisló ácido **ursólico (2)** (25 mg, 0.025 %) como un sólido amorfo blanco, con pf= 282-285 °C (descrito: 284-285 °C, Seebacher, 2003).

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

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (40/60) se obtuvo, mediante recristalización, en un sistema de AcOEt/hexano, una mezcla de **5,8-dihidroxi-6, 7, 4'-trimetoxiflavona (3)** (sinónimos: **8-hidroxisalvigenina o pedunculina**), como un sólido cristalino amarillo (540 mg, 0.054 %), esta mezcla fue reunida con las fracciones eluidas con hexano/ AcOEt (60/40) del extracto de AcOEt.

Extracto de Acetato de Etilo 85 g (8.5 %)

Las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (60/40) se reunieron y se recromatografiaron en una columna relámpago (Still, 1978) de 1 cm de diámetro y 10 cm de altura empacada con sílice (malla 230-400) utilizando como eluyente una mezcla de CHCl<sub>3</sub>/MeOH al 0.1 % de esta cromatografía se aislaron 150 mg (0.015 %) de **5,8-dihidroxi-6,7,4'- trimetoxiflavona (3)**, como

un sólido cristalino amarillo, con punto de fusión 270-274 °C. Este producto se identificó por comparación de sus características físicas y espectroscópicas con las descritas en la literatura (Grayer, 2001). A continuación se describen sus características espectroscópicas.

EM: IE m/z 344 [ $M^+$ ] (90) ( $C_{18}H_{16}O_7$ ), 327 [ $M^+-17$ ] (100), 210 (25). RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300MHz),  $\delta$ (ppm), (J, multiplicidad, J, asignación): 12.65 (s, H-5) y 9.6 (s, H-8), 7.85 y 6.99 (4H, sistema AA'BB', J = 8.7, H-2' y H-6', H-3' y H-5'), 6.6 (1H, s, H-3), 4.10, 3.97, y 3.94, ( 3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>, 7-OCH<sub>3</sub>, y 4'-OCH<sub>3</sub>, señales intercambiables).

RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 75MHz),  $\delta$ (ppm), (asignación): 159.1 (C-5), 149.5, 128.0 (C-2' y C-6'), 116.2 (C-3' y C-5'), 103.8 (C-2), 62.1, 61.1, 56.1 (-OCH<sub>3</sub>, C-6, C,7 y C-8, señales intercambiables).

Las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (60/40) se reunieron y se recromatografiaron en una columna relámpago de 1 cm de diámetro y 10 cm de altura empacada con sílice (malla 230-400) utilizando como eluyente una mezcla de cloroformo/metanol al 0.1 % de las primeras fracciones de esta cromatografía se aislaron 984 mg (0.098 %) de **5-hidroxi-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavona o 5-desmetoxinobiletina (4)**, (Vieira, 2003) como un sólido cristalino amarillo, con pf= 177-178 °C (pf= 145-146 °C, Venturella, 1961).

EM: IE m/z (abundancia relativa) 388 [ $M^+$ ] (55) ( $C_{20}H_{20}O_8$ ), 373 [ $M^+-15$ ] (95), 211 (15), 119 (5), 85 (100).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz),  $\delta$ (ppm), ( $\int$ , multiplicidad, J, asignación): 7.60, (1H, dd, J= 8.4, 2.1, H-6'), 7.42 (1H, d, J= 2.1, H-2'), 7.01 (1H, d, J= 8.7, H-5'), 6.63 (1H, s, H-3), 4.12, 4.00, 3.99, 3.98, 3.97 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>, 7-OCH<sub>3</sub>, 8-OCH<sub>3</sub>, 3'-OCH<sub>3</sub>, 4'-OCH<sub>3</sub> (señales intercambiables)).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz),  $\delta$ (ppm), (asignación): 182.9 (C-4 carbonilo), 163.93 (C-2) y 62.07, 61.72, 61.13, 56.13, 56.02, (correspondientes a 5 -OCH<sub>3</sub>).

De las fracciones intermedias de esta columna aislaron 14 mg de **4'-O-metilnaringenina (5)** (sinónimo; **ponciretina**) como un sólido cristalino amarillento, con pf= 232-245 °C. Este producto fue identificado por comparación con una muestra auténtica.

Se aislaron por recristalización 25 mg de **naringenina (6)**, como un sólido cristalino amarillo con pf= 243-245 °C, C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> con un peso molecular a m/z= 272, el cual fue caracterizado por sus propiedades físicas y espectroscópicas que se describen a continuación.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  + DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz),  $\delta$ (ppm), ( $\int$ , multiplicidad, J, asignación): 7.30 (2H, sistema AA'BB', J= 8.8, H-2' y H-6'), 6.78 J= 8.4, H-3' y H-5'), 5.87 (2H, s, H-6 y H-8), 5.41 (1H, dd, de un sistema ABX, J= 12.8 y 2.8, H-2X), 3.243 (1H, t, del sistema ABX, J= 17.2, H-3B) y 2.66 (1H sistema ABX, J= 17.2, H-3A).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  + DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz),  $\delta$ (ppm), (asignación): 196.1 (C-4), 166.69 (C-7), 163.55 (C-5), 162.99 (C-9), 157.78 (C-4'), 128.90 (C-1'), 128.39 (C-2' y C-6') y 115.22 (C-3' y C-5'), 101.82 (C-10), 95.86 (C-6), 95.03 (C-8), 78.49 (C-2) y 42.02 (C-3).



De las fracciones siguientes de esta columna se aislaron por recristalizaciones sucesivas 17 mg de **gardenina B (7) (5-hidroxi-6, 7, 8, 4'-tetrametoxiflavona, (sinónimo: desmetiltangeretina)** como un sólido con  $pf = 179-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ( $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{O}_{13}$ ) una masa molar de 358 uma, cuyas características espectroscópicas se describen a continuación:

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz),  $\delta(\text{ppm})$ , ( $J$ , multiplicidad,  $J$ , asignación): 12.58 (1H, s, H-5), 7.91 y 7.04 (4H, sistema AA'BB'H-2', H-6' y H-3', H-5'), 6.61 (1H, s, H-3), 4.12, 3.98, 3.96 y 3.91 (12H, s, H-6, H-7, H-8 y H-4', respectivamente).

Las fracciones eluidas con AcOEt /MeOH (80/20) se separaron por medio de cromatografía de capa preparativa utilizando, como medio de elución una mezcla de hexano/cloruro de metileno/metanol (20/60/20), de la cual se aislaron 1160 mg (0.116 %) de **neoponcirina (8)** (sinónimos: isosakuranetina-7-O-rutinosido, didimina) como un sólido blanco, con punto de fusión de 246-248  $^{\circ}\text{C}$  (descomposición) ( $pf = 210-212\text{ }^{\circ}\text{C}$  descrito; Ventura, 1980):

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

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 300MHz),  $\delta(\text{ppm})$ , ( $J$ , multiplicidad,  $J$ , asignación): 12.01, (1H, s, 5-OH), 7.46, 6.97 (4H, sistema AA'BB',  $J = 8.7$ , H-2' y H-6', H-3' y H-5'), 6.12 (2H, s, 6-H, 8-H), 5.56 (1H, dd, H-2), 4.96 ( $J = 7.2$ , anomérico de glucosa), 4.50 (anomérico de ramnosa).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 75 MHz),  $\delta(\text{ppm})$ , (asignación): 196.99 (C-4 carbonilo), 165.1 (C-5), 162.97, 162.52, 159.47, (C-9, C-10, C-1') señales intercambiables, 159 (C-4'), 128.4 (C-2', C-6'), 113.87 (C-3', C-5'), 103.2

(anomérico de ramnosa), 100.5 (anomérico de glucosa), 96.4 (C-6), 95.4 (C-8), 78.2 (C-2), región de 76.2 a 65.9 (C-O, de glucosa y ramnosa), 55.1 (-OCH<sub>3</sub>), 41.8 (C-3), 17.76 (-CH<sub>3</sub> de la ramnosa).

Las fracciones eluidas con AcOEt/metanol (80/20) se reunieron y se separaron por medio de cromatografía de capa preparativa, utilizando, como medio de elusión una mezcla de hexano/cloruro de metileno/metanol (20/60/20), de la cual se aislaron (100 mg, 0.01 %). de **hesperidina (7-O-rutinosido de hesperetina)(9)** (Da-yong, 2006), como un sólido blanco, cuyo punto de fusión fue superior a los 280 °C.(pf= 257-260 °C; Merck index).

EM: IE m/z 608 [M<sup>+</sup>] (C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>15</sub>), 286 (80), 134 (100).

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

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

Extracto de metanol (96 g 9.6 %)

Las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (80/20) que mostraron el mismo perfil en ccf, se reunieron y se separaron por columna al vacío.

De las fracciones eluidas con AcOEt/MeOH (80/20) se obtuvo un sólido amorfo blanco, (2516 mg, 2.516 %). El análisis de esta muestra en ccf indicó la presencia de tres productos, los cuales fueron separados por cromatografía relámpago usando como medio de elución una mezcla de hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (20/60/20), de esta columna se aislaron 1520 mg de **neoponcirina (8)**, 200 mg **hesperidina (9)** y 25 mg **naringina (10)**(4',5,7-trihidroxi-flavanona-7-ramnoglicósido o 4',5,7-trihidroxi-flavanona-7-rutinósido, sin.: naringósido), este último como un sólido amarillo con *mp*= 163-165 °C, C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>O<sub>14</sub> M<sup>+</sup>= 580, a continuación se describen sus características espectroscópicas.

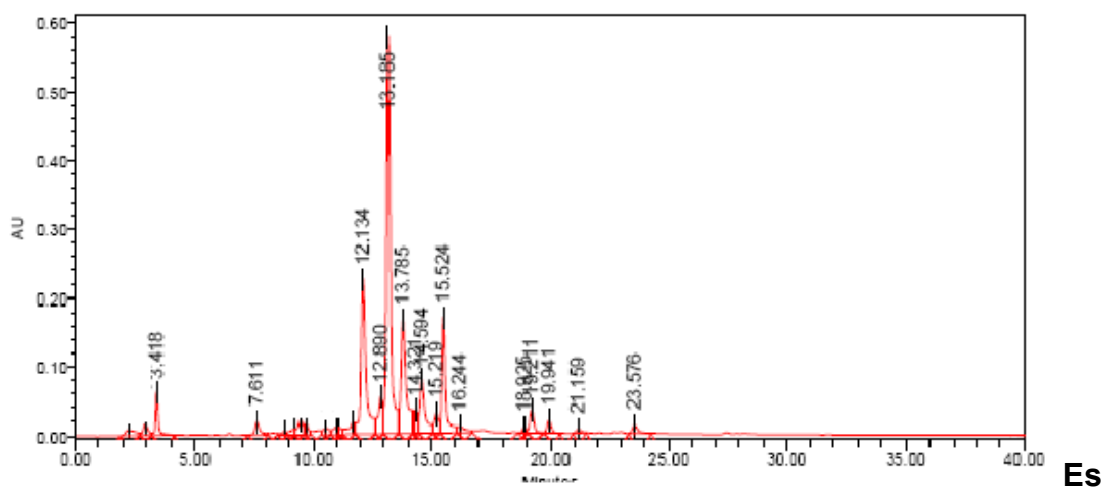
RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz), δ(ppm), (J, multiplicidad, J, asignación): 12.62 (1H, s, -OH C-5), 9.4 (1H, s, -OH C-4'), 7.31 (2H, dd, J= 7.5, 4, H-6' y H-2'), 6.79 (2H, dd, J= 8.5, 1.5, H-5' y H-3') 6.11 (1H, t, J= 2, H-6), 6.08 (1H, t, J= 2, H-8), 5.48 (1H, dt, J= 11, 3, H-2), 5.14–5.09 (1H, m, H-1'', anomérico de la glucosa), 5.14-5.09 (1H, m, anomérico de la ramnosa), 3.67 (1H, m, H-6'') y 3.48 (1H, m, H-6'') 3.31 (1H, m, J= 12.5, 17, 3, H-3<sub>ax</sub>), 2.72 (1H, dt, J= 15, 3, H-3<sub>eq</sub>), 1.16 (3H, dd, J= 5.75, 1.5, -CH<sub>3</sub> ramnosa).

RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>, 125 MHz), δ (ppm), (asignación): 197.29 (C-4), 157.88 (C-4'), 164.87 (C-7), 163.00 (C-5), 162.87 (C-9), 128.55 (C-2' y C-6'), 103.41 (C-10), 100.5 (C-1'', anomérico de la ramnosa), 97.47 (C-1''', anomérico de la glucosa), 96.36 (C-6), 95.23 (C-8) 78.78 (C-2), 77.19 (C-2'') 76.92 (C-3''), 76.22 (C-5''), 71.19 (C-4''), 70.57 (C-2''') y 70.45 (C-2''' y C-3''' intercambiables),

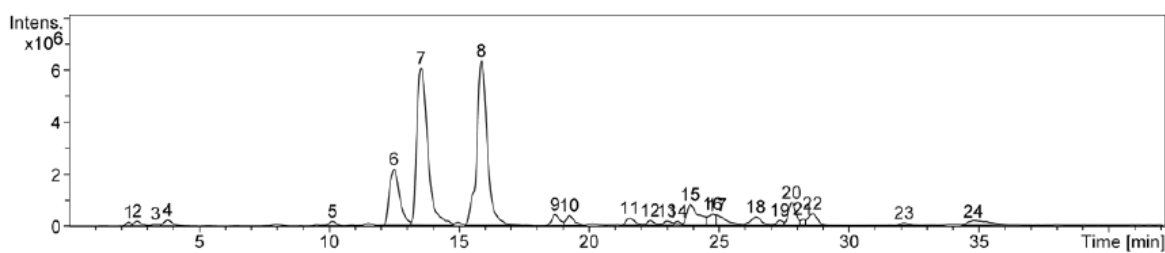
69.68 (C-4'''), 68.35 (C-5'''), 60.52 (C-6'', -CH<sub>2</sub>, de la glucosa), 42.11 (C-3), 18.08 (C-6''', -CH<sub>3</sub> de la ramnosa).

Análisis del extracto acuoso de *Clinopodium mexicanum*, mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia acoplado a un Espectrómetro de Masas con re-arreglo de diodos y Trampa de Iones (CLAE-EM-TI).

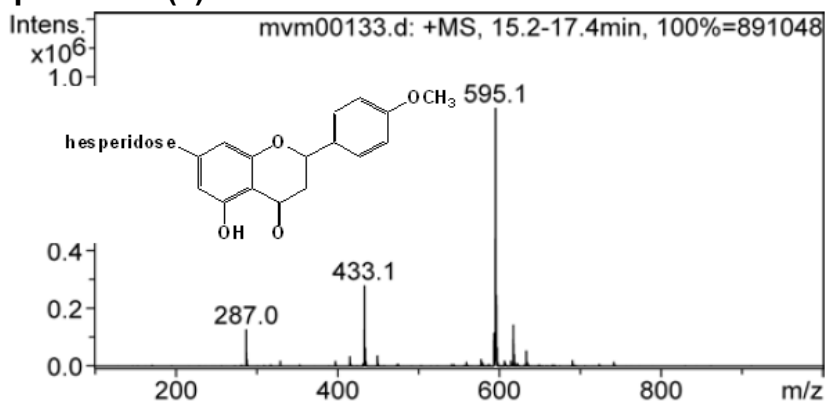
### Perfil de CLAE



### Espectro de Masas

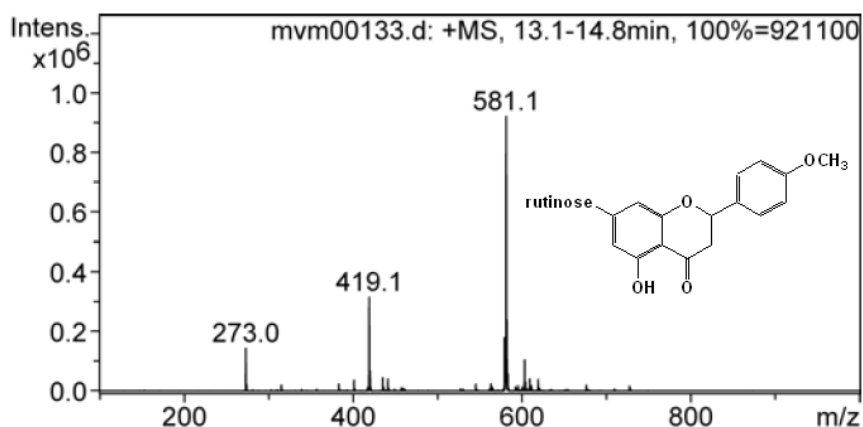


### Pico 6 Neoponcirina (8)



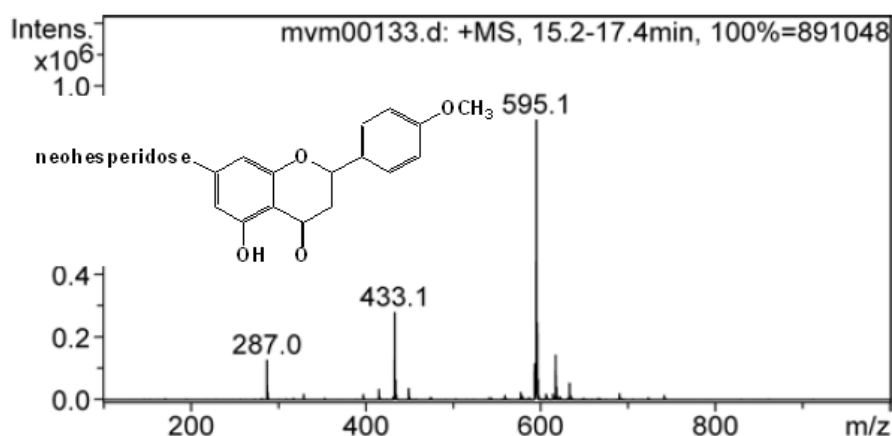
TR= 12.13 min, % área = 16.19, [M+H]= 595

**Pico 7 Isonaringina**



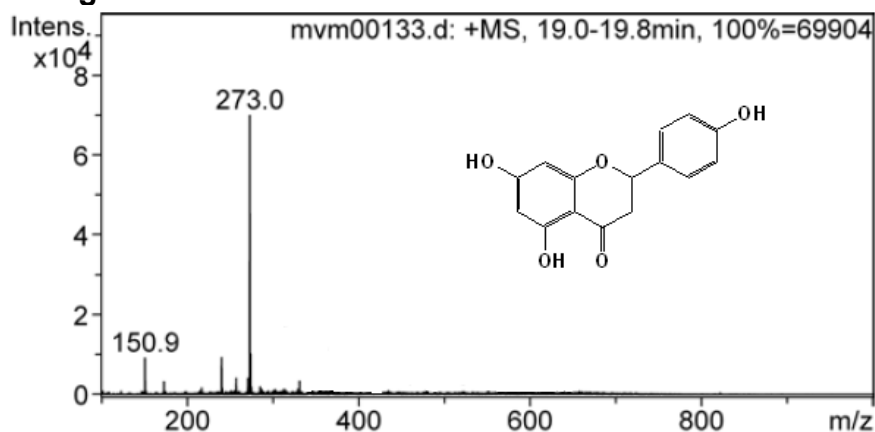
TR= 13.18 min, % área= 29.88, [M+H]= 581

**Pico 8 Poncirina**



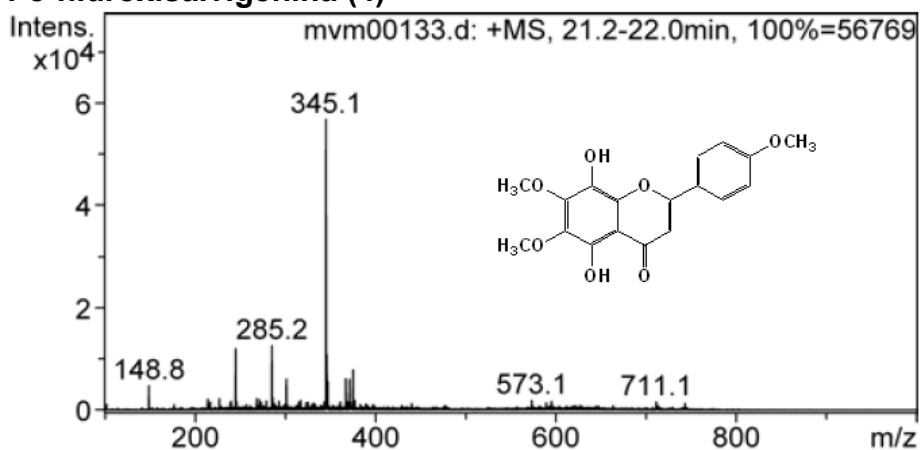
TR= 15.2 min, % área= 9.18, [M+H]= 595

**Pico 10 Naringenina**



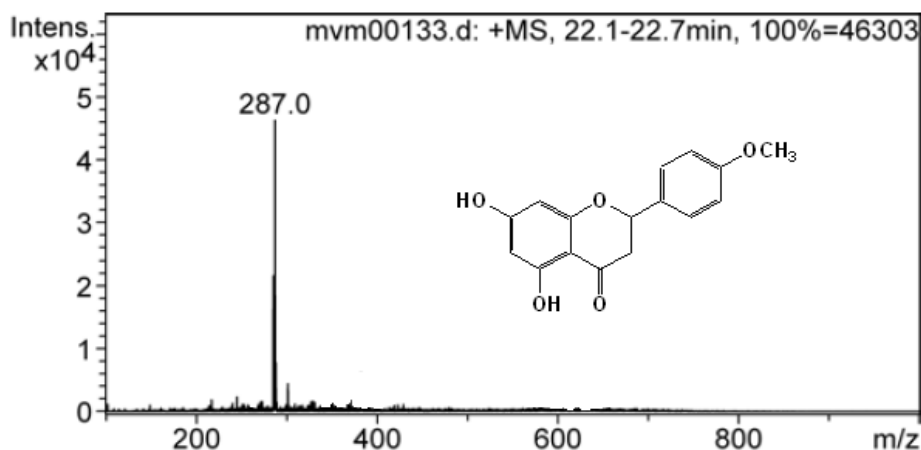
TR= 19.21 min, % área= 1.99, [M+H]= 273

**Pico 11 8-hidroxisalvigenina (4)**



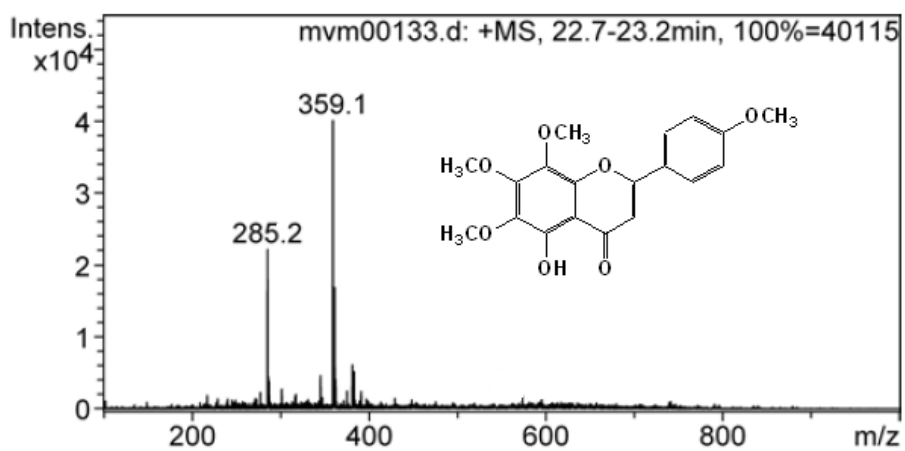
TR= 21.22 min, % área= 0.36, [M+H]= 345

**Pico 12 4'-O-metilnaringenina (5)**



TR= 22.3 min, % área= 0.20, [M+H]= 287

**Pico 13 Gardenina B (7)**



TR= 0 23.57 min, % área= 0.95, [M+H]= 359

***Dracocephalum moldavica* L. “toronjil azul o toronjil extranjero”**

**Determinación de aceites esenciales**

Las partes aéreas frescas de *D. moldavica* se sometieron a destilación por arrastre de vapor para obtener sus aceites esenciales fijos, los cuales fueron analizados en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890II acoplado a un espectrómetro de masas, equipado con una columna capilar de 25 m × 0.2 mm, con diámetro interno de 0.33 µm. La identificación de los componentes se realizó por comparación de sus patrones de fragmentación con los de la base de datos del equipo (NIST3.0) y por comparación con los descritos en la literatura. El porcentaje de abundancia relativa se determinó como el área bajo la curva de cada pico. Los productos identificados se presentan en la siguiente tabla:

**Aceites esenciales identificados en las partes aéreas de *Dracocephalum moldavica* “toronjil azul”**

Compuesto	fórmula	Área relativa (%)	tiempo de retención (min)	Ion molecular (M <sup>+</sup> )
-----		0.382	13.2	206
-----		0.631	15.25	206
citral	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	29.96	16.7	152
geraniol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	55.627	17.38	154
acetato (E)-geraniol	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	9.553	19.84	196
		2.001	22.23	

---

total	96.15
-------	-------

---

Extracto de hexano (20 g, 2 %).

De las fracciones eluidas con AcOEt/hexano (0.5:95) se aislaron por recristalización en metanol 500 mg (0.1%) de  **$\beta$ -sitosterol (1)**.

De las fracciones eluidas con AcOEt/hexano (1:9) se aislaron 500 mg (0.01%) de **ácido ursólico (2)**, como un sólido blanco verdoso con  $pf = 286-288$  °C, el cual fue identificado por comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas con las descritas en la literatura y por comparación con un muestra auténtica.

Extracto de acetato de etilo

El extracto de AcOEt 14.0 g (1.4 %) se disolvió en acetona y se filtró, de este procedimiento se aislaron 1.5 g (0.3%) de ácido ursólico. El resto del extracto se fraccionó de la misma forma que la antes descrita para el extracto de hexano.

De las fracciones eluidas al con hexano/AcOEt (9.5:0.5), se aislaron 80 mg (0.016 %) de una mezcla de **estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol**.

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (9:1) se aislaron 150 mg (0.03%) de ácido ursólico.

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (6:4) se aislaron 20 mg (0.004%) de **acacetina (11)** como un sólido de color amarillento con  $pf = 272-274$  °C la identificación de este producto se realizó por medio de sus características espectrométricas y espectroscópicas descritas a continuación.

EM: 284 [M<sup>+</sup>], (C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>).



RMN  $^1\text{H}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-d}_6$ ),  $\delta$  (ppm) ( $J$ , multiplicidad,  $J$ , asignación): 12.79 (1H, s, OH), 10.24 (1H, s, OH), 7.85 y 7.02 (4H, sistema AA'BB', H-2' y H-6', H-3' y H-5'), 6.54 (1H, s, H-3), 6.44 y 6.26 (2H, sistema AB, 2.1 Hz, H-8 y H-6), 3.89 (3H, s, 4'-OMe).

RMN  $^{13}\text{C}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) (asignación): 181.569 (C-4), 163.782 (C-7), 163.082 (C-9), 161.888 (C-5), 161.407 (C-2), 157.182 (C-4'), 127.405 (C-2, C-6'), 122.859 (C-1'), 113.90 (C-3', C-5'), 103.877 (C-10), 103.294 (C-3), 98.822 (C-6),

De las primeras fracciones eluidas con AcOEt, aquellas que mostraron el mismo perfil en ccf reunieron y separaron por cromatografía en placa preparativa. Se utilizó como sistema de elución una mezcla AcOEt/hexano (1:1). De la fracción de polaridad media se aislaron 12 mg (0.0024 %) de **apigenina (12)** como un sólido de color verde con p.f.  $> 290^\circ\text{C}$  (pf descrito  $352^\circ\text{C}$ ).

EM: Por la técnica de  $\text{FAB}^+$ ,  $m/z$ : 271 ( $\text{M}^+ + 1 \text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$ ).

RMN  $^1\text{H}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO}$ ),  $\delta$  (ppm) ( $J$ , multiplicidad,  $J$ , asignación): 12.88 (1H, s, OH), 10.15 (1H, s, OH), 9.74 (1H, s, OH), 7.76 y 6.95 (4H, sistema AA'BB', H-2' y H-6', H-3' y H-5'), 6.49 (1H, s, H-3), 6.43 y 6.26 (2H, sistema AB, 2.1 Hz, H-8 y H-6).

RMN  $^{13}\text{C}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) (asignación): 181.657 (C-4), 164.07 (C-7), 161.42 (C-9), 160.79 (C-5), 160.59 (C-2), 152.25 (C-4'), 127.55 (C-1'), 127.47 (C-2, C-6'), 121.38 (C-3), 115.60 (C-3', C-5'), 102.69 (C-10), 98.76 (C-6) y 93.57 (C-8).

9 mg de **Luteolina (13) 5,7,3'4'-tetrahidroxiflavona**, como un sólido amarillento con p.f.> 300°C

EM: Por la técnica de FAB<sup>+</sup>, (M<sup>+</sup>+1): 289, pico principal m/z: 271, con una fórmula molecular C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>, requiere un peso molar de 286.

RMN <sup>1</sup>H: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, DMSO), δ (ppm) (J, multiplicidad, J, asignación): 12.88 (1H, s ancho, -OH), 10.0 (1H, s, ancho, -OH), 9.52 (1H, s ancho, -OH) 7.2(1H, s ancho, H-5), 6.70 (1H, s, H-3), 6.40 y 6.25 (2H, sistema AB, 2.1 Hz, H-8 y H-6), 6.72, (1H, dd, J= 2.1, H-6') 7.2 (1H, dd, J =8.4 =2.1, H -2'), 6.9 (1H, dd, J =8.4, 2.1, H-3').

De esta misma cromatografía se aislaron 13 mg de **5,8-dihidroxi-6, 7, 4'-trimetoxiflavona (3) (sinónimos: 8-hidroxisalvigenina o pedunculina)**.

De las siguientes fracciones eluidas con AcOEt, se obtuvo 300 mg (0.06 %) de **daucosterol (14)** como un polvo blanco con punto de descomposición de 255-257 °C (punto de descomposición descrito, 283-286 °C) que se identificó por sus propiedades físicas y espectroscópicas.

EM: FAB<sup>+</sup>, [M<sup>+</sup>+23], m/z: 599, M<sup>+</sup> 576, (C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>).

RMN <sup>1</sup>H: (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ (ppm) (J, multiplicidad, J, asignación): 5.33 (1H, s, ancho, H-6), 4.89 (3H, m, OH-2', OH-3' y OH-4'), 4.44 (1H, t, 5.6 Hz, OH-6'), 4.21 (1H, d, 7.6 Hz, H-1') y 3.6 (1H, dd, 11.0, 5.6 Hz, H-6'a ).

**RMN <sup>13</sup>C:** (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ (ppm) (asignación): 140.455 (C-5), 121.245 (C-6), 100.79 (C-1'), 76.911 (C-3), 76.775 (C-3' y C-5'), 73.467 (C-2'), 70.099 (C-4'), 61.086 (C-6'), 56.185 (C-14), 55.443 (C-17), 49.615 (C-9), 45.139 (C-24), 41.862 (C-13), 36.855(C-1), 36.217 (C-10), 35.504 (C-20), 33.350 (C-22),

31.423 (C-7 y C-8), 29.283 (C-2), 28.707 (C-25), 27.812 (C-16), 25.414 (C-23), 23.883 (C-15), 22.607 (C-28), 20.620 (C-11), 19.740 (C-27), 19.118 (C-19), 18.951 (C-26), 18.632 (C-21), 11.789 (C-29) y 11.683 (C-18).

Extracto de metanol (18 g, 1.8 %).

Se aislaron por precipitación 235 mg de **7-O-glucosil acacetina (15)**, como un sólido amarillento, el cual se purificó por recristalización, con un punto de fusión de 230-232 °C

EM:  $[M^+ + 1]$ , a  $m/z = 447$ , requiere una fórmula molecular:  $C_{22}H_{22}O_{10}$ .

RMN  $^1H$ : (300 MHz,  $CDCl_3$ , DMSO),  $\delta$  (ppm) (J, multiplicidad, J, asignación): 13.3 (1H, s, OH), 8.07 y 7.14 (4H, sistema AA'BB', H-2' y H-6', H-3' y H-5'), 6.96 (1H, s, H-3), 6.86 y 6.46 (2H, sistema AB, 1.8 Hz, H-8 y H-6), 5.40, 5.07 y 4.62 (4H, s, OH glucosa), 5.07 (1H, d, H-2 glucosa), 3.87 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>) y 3.735-3.2121 (5H, varias señales, protones del anillo de glucosa).

De las fracciones de polaridad media se aisló por precipitación un sólido blanco amorfo, que resultó ser una mezcla de dos productos de tipo flavonoide, los cuales fueron purificados mediante una columna cromatográfica al vacío, utilizando como eluyente mezclas de ACOEt- MeOH, H<sub>2</sub>O (80/18/2), de la cual se aislaron por cristalización 245 mg de **(2''acetil)-7-O-glucosil acacetina (16)**. como un sólido amorfo blanco con  $pf = 228-230$  °C

RMN  $^1H$ : (300 MHz,  $CDCl_3$ , DMSO),  $\delta$  (ppm) (J, multiplicidad, J, asignación): 12.83 (1H, s, OH), 7.91 y 7.04 (4H, sistema AA'BB', J= 6.9, H-2' y H-6', H-3' y H-5'), 6.65 (1H, s, H-3), 6.64 (1H, d, J= 2.2, H-8) y 6.39 (1H, d, J= 2.1, H-6) 5.14 (1H, d, J= 8.04, H-1'', anomérico de la glucosa), 5.00 (1H, dd, J= 8.09, 9.27, H-2''), 3.89 (3H, s, 4'-OMe), 2.09 (3H, s, -<sub>2</sub>OCCH<sub>3</sub>, en el C-2'').

RMN  $^{13}\text{C}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) (asignación): 182.06 (C-4), 169.31 (-CO- $\text{CH}_3$  en C-2'), 163.88 (C-7), 162.50 (C-2), 162.28 '(C-9), 161.24(C-5), 156.90 (C-4'), 127.53 (c-2'y C 8')122.59 (c1'), 113.96 (C3'y C-5'), 105.87 (C-10), 103.63 (C-3), 99.25 (C-6), 97.95 (C-1''), 94.46 (C-8), 76.22 (C-5'''), 74.19 (C-3'''), 72.56 (C-2''), 70.02 (C-4''), 61.10 (C-6''), 54.92 (C-4'), 20.36 ( $\text{CH}_3\text{-CO}_2$ -).

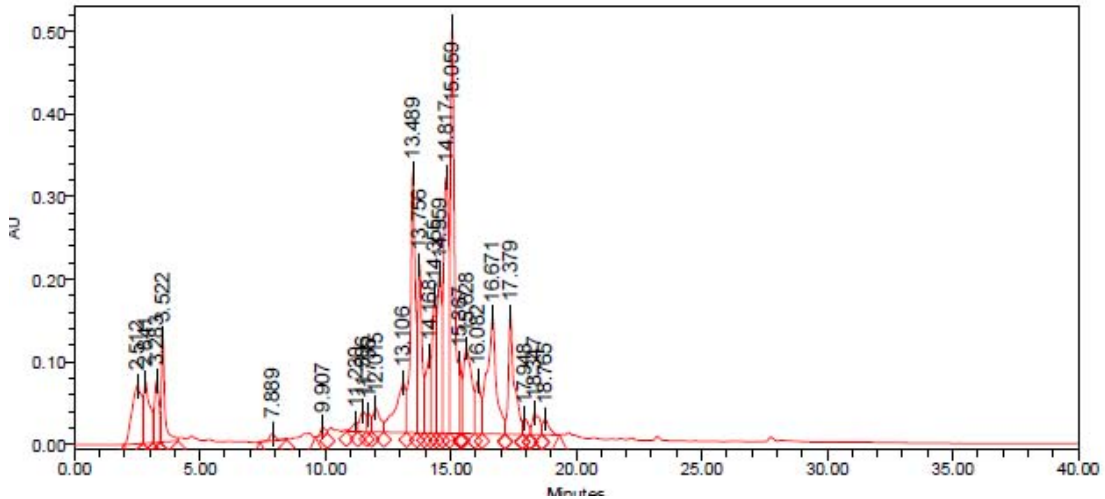
De las fracciones eluidas con MeOH se obtuvo por precipitación con acetona 1 g (0.2 %) de un sólido blanco amorfo, el cual resulto ser una mezcla de **glucosa y sacarosa**.

De las aguas madres de estas fracciones se aisló como un sólido amorfo blanco el ácido málico con un  $\text{pf} = 123\text{-}126\text{ }^\circ\text{C}$  cuyas propiedades espectroscópicas se describen a continuación:

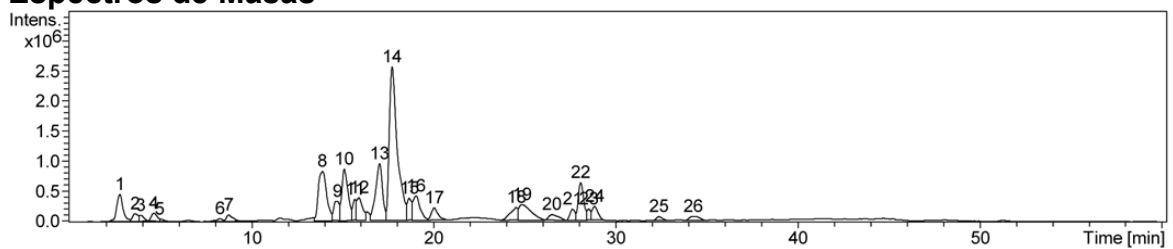
RMN  $^1\text{H}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , DMSO),  $\delta$  (ppm) ( $J$ , multiplicidad, J, asignación): 11-12 (señal simple ancha H de  $-\text{CO}_2\text{H}$ , H-1 y H-4), 4.2 (1H, señal múltiple, H-2), 2.62 (1H, dd,  $J = 7, 4$  Hz,  $\text{H}\alpha\text{-3}$ ), 2.52 (1H, dd,  $J = 7, 4$  Hz,  $\text{H}\beta\text{-3}$ ).

Análisis del extracto acuoso de *Dracocephalum moldavica*, mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia acoplado a un Espectrómetro de Masas con re-arreglo de diodos y Trampa de Iones (CLAE-EM-TI).

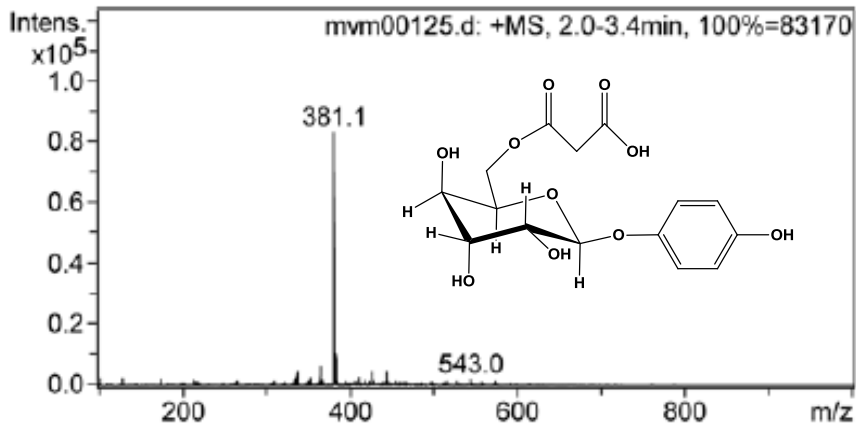
#### **Perfil por CLAE**



**Espectros de Masas**

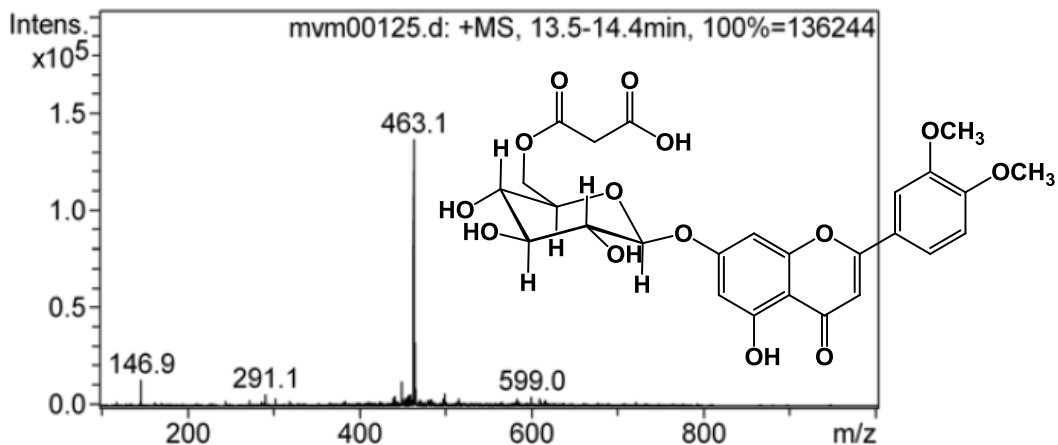


**Pico 1 éster malónico 6-β-O-de arbutina**



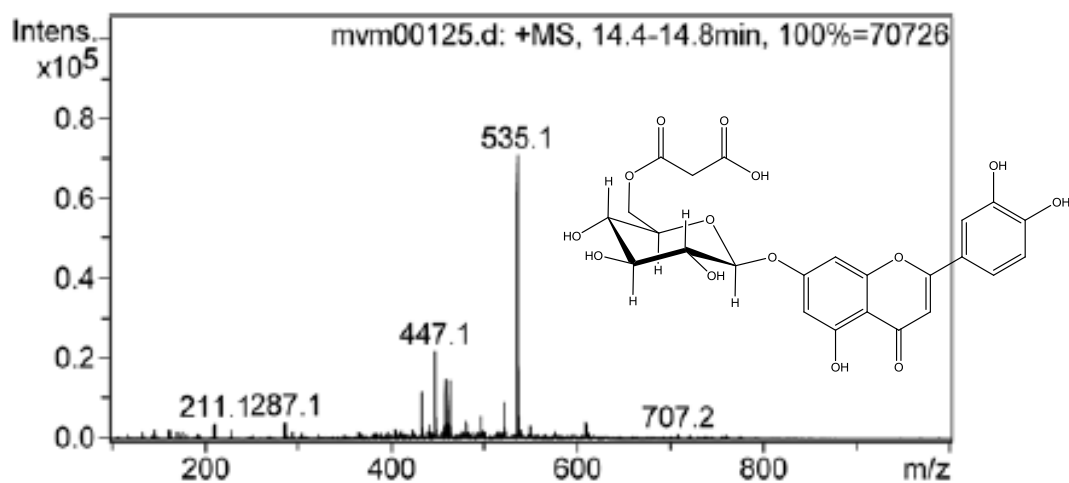
TR= 2.26 min, 7.52 % área relativa M<sup>+</sup> + Na= 381 C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub>

**Pico 3 7-β-O-glucopiranosido de diosmina**



TR= 13.9 min, 9.73 % área relativa, M<sup>+</sup> +H 463 C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub>

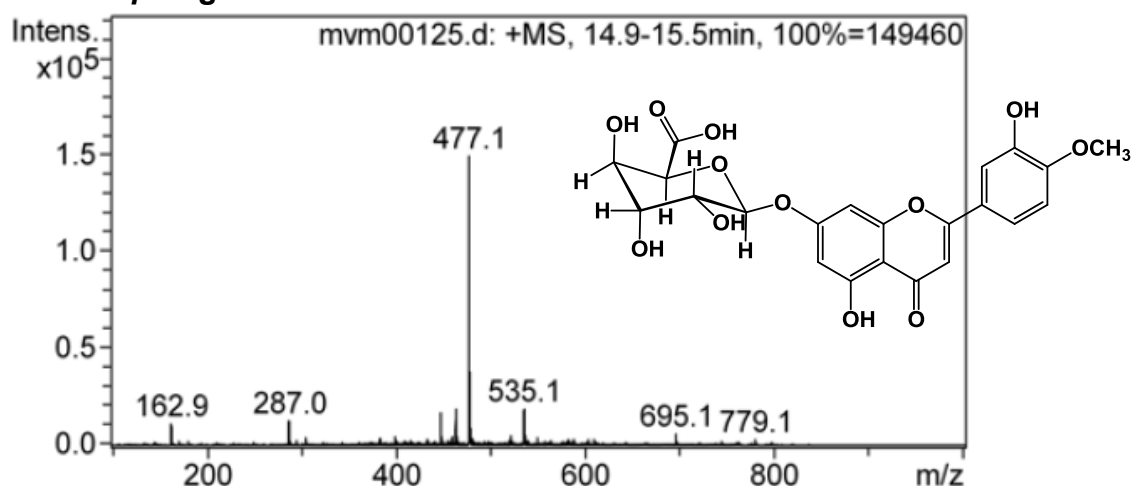
**Pico 4 7-β-O-(6''-O-malonil)-glucósido de luteolina**



TR

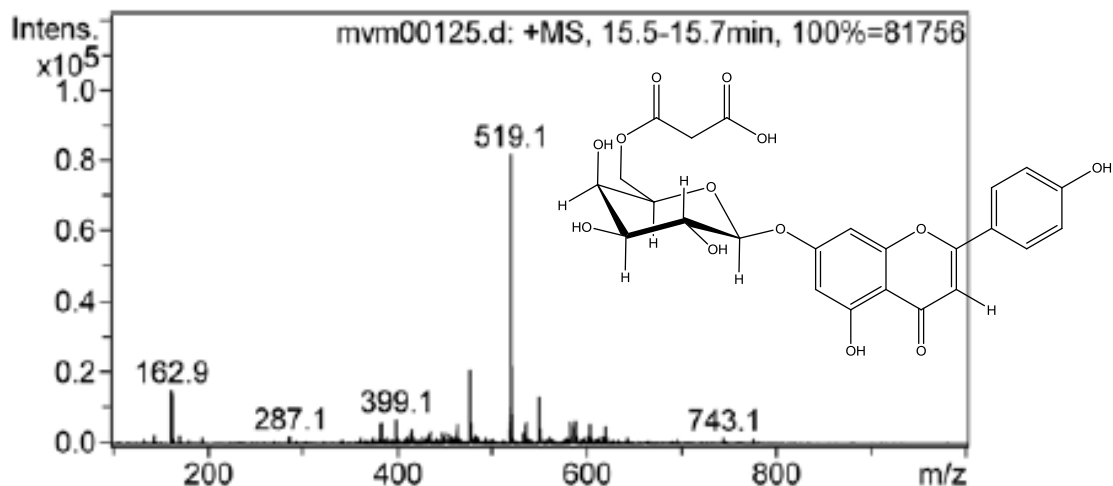
= 14.7 min, 5.91 % área relativa, M<sup>+</sup> +H 535, C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>O<sub>14</sub>

**Pico 5 7-β-O-glucuronido de diosmetina**



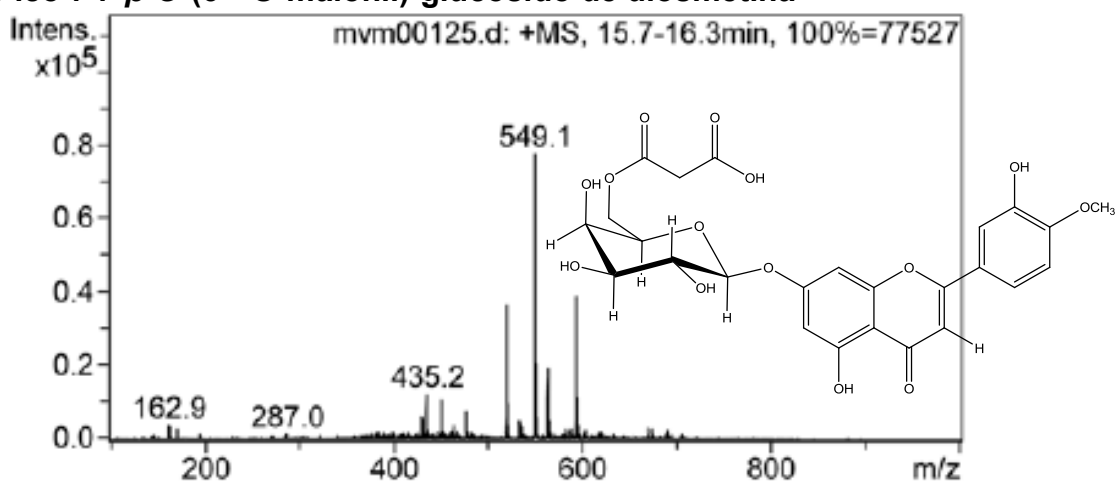
TR= 15.1 min, 2.89 % área relativa, M<sup>+</sup> +H= 477, C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>

**Pico 6 7-β-O-(6''-O-malonil)-glucósido de apigenina**



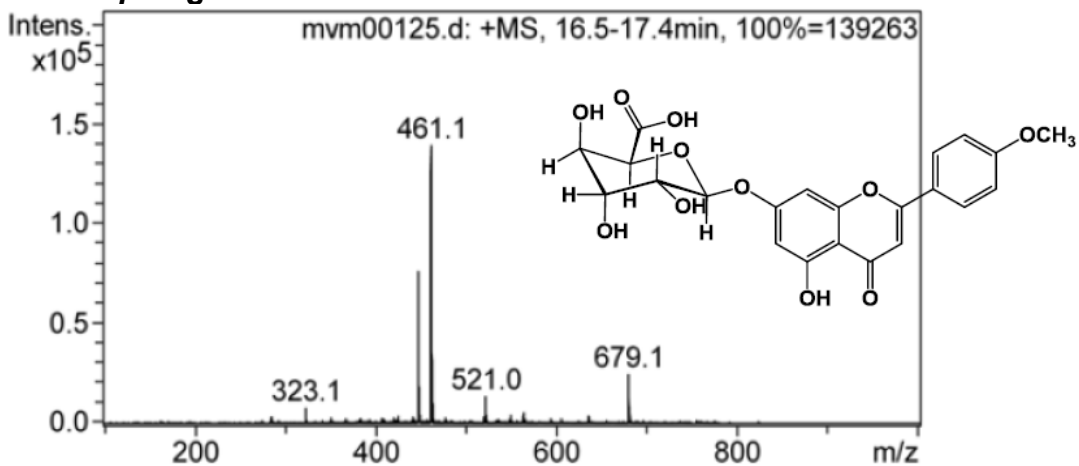
TR= 15.7 min, 4.52 % área relativa,  $M^+ + H = 519$   $C_{24}H_{22}O_{13}$

**Pico 7 7- $\beta$ -O-(6''-O-malonil)-glucósido de diosmetina**



TR= 15.9 min, 5.68 % área relativa,  $M^+ + H = 549$ ,  $C_{25}H_{24}O_{14}$

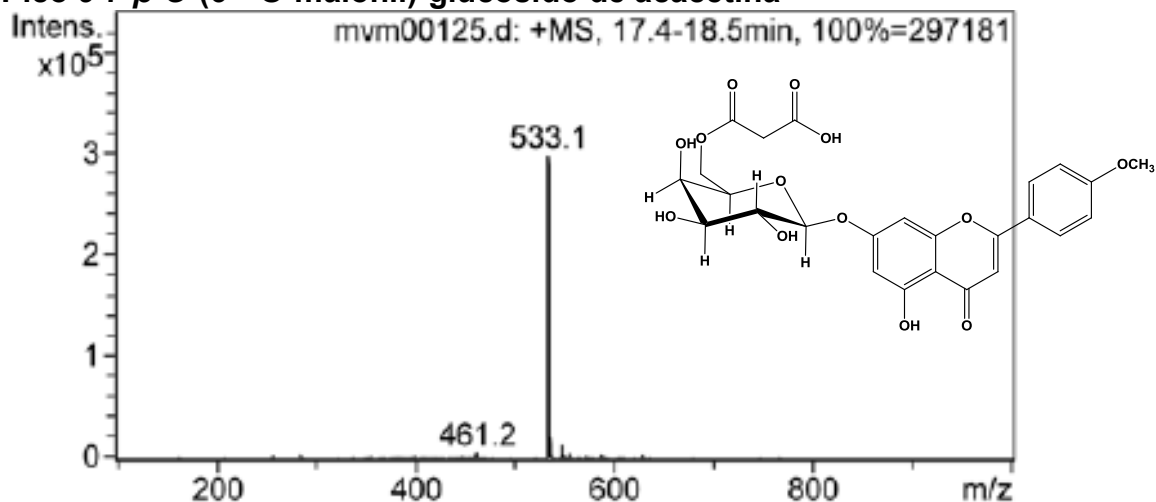
**Pico 8 7- $\beta$ -O-glucuronido de acetina**



= 17 min, 10.30 % área relativa,  $M^+ + H = 461$ ,  $C_{22}H_{20}O_{11}$

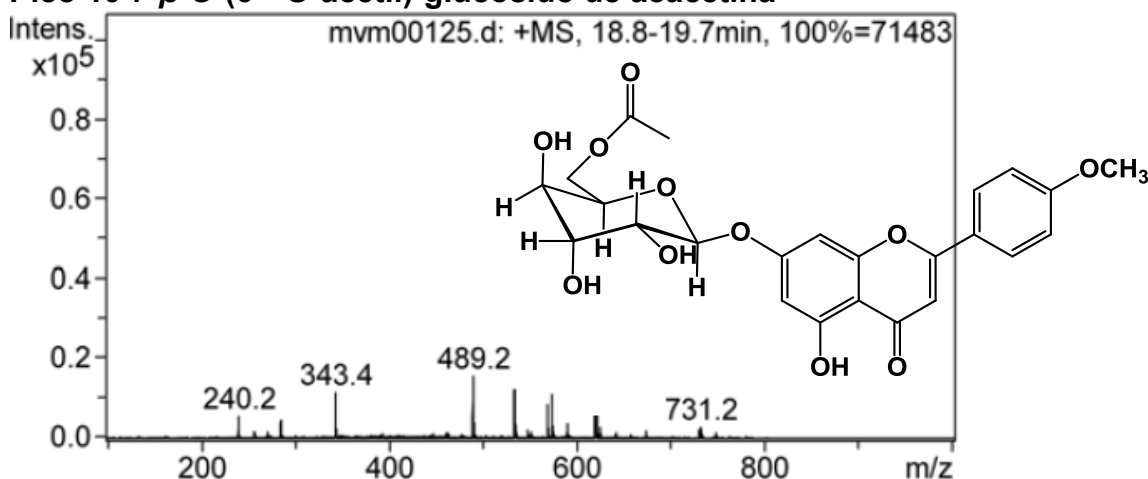
TR

**Pico 9 7-β-O-(6''-O-malonil)-glucósido de acetina**



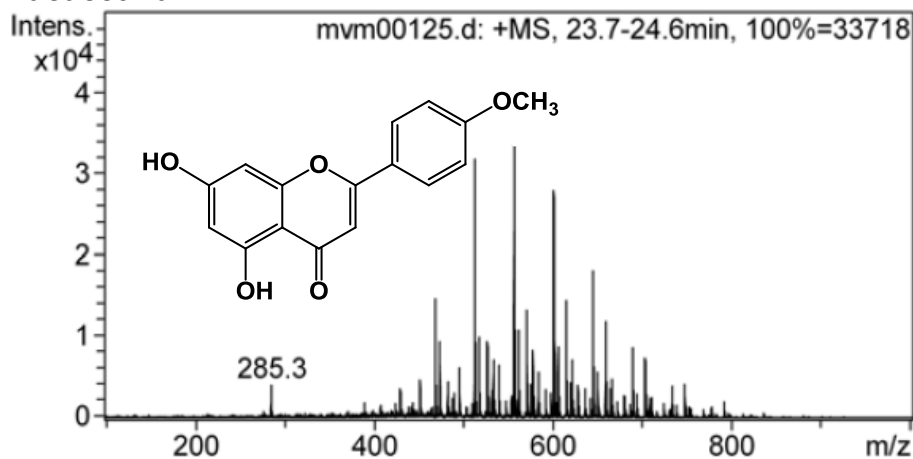
RT= 17.7 min, 14.11 % área relativa,  $M^+ + H = 533$ ,  $C_{25}H_{24}O_{13}$

**Pico 10 7-β-O-(6''-O-acetil)-glucósido de acetina**



TR= 19 min, 1.52 % área relativa,  $M^+ + H = 489$ ,  $C_{24}H_{24}O_{11}$

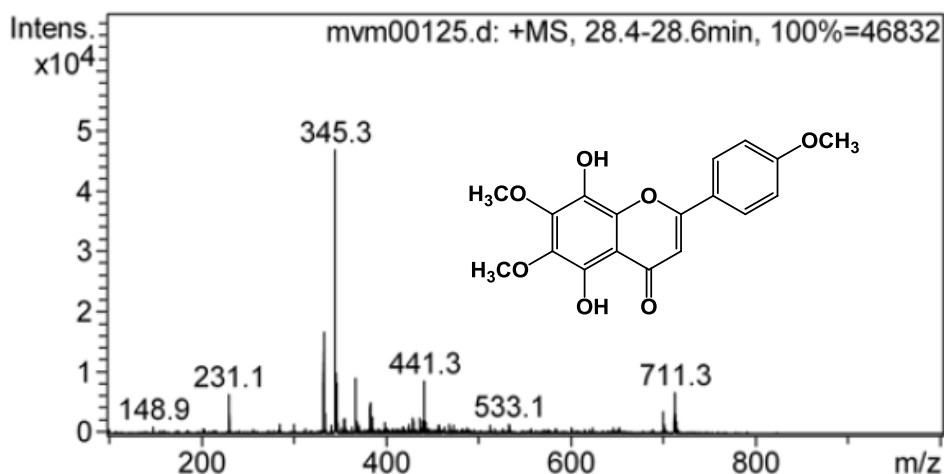
**Pico 11 acetina**



TR= 24.5 min, 0.1 % área relativa,  $M^+ + H = 285$ ,  $C_{16}H_{12}O_5$

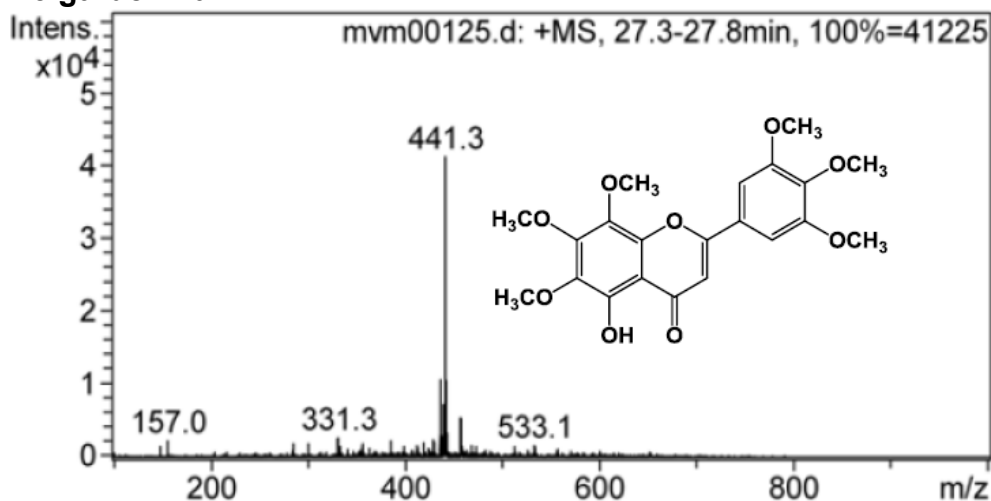


**Pico12 Diosmetina**



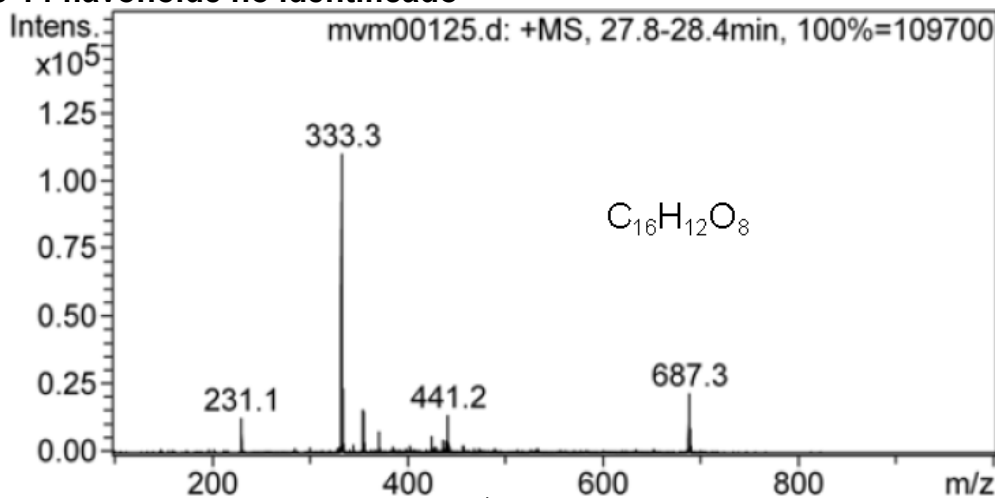
TR= 26.5 min, 2.33 % área relativa, M<sup>+</sup> +H= 301, C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>

**Pico 13 gardenina A**



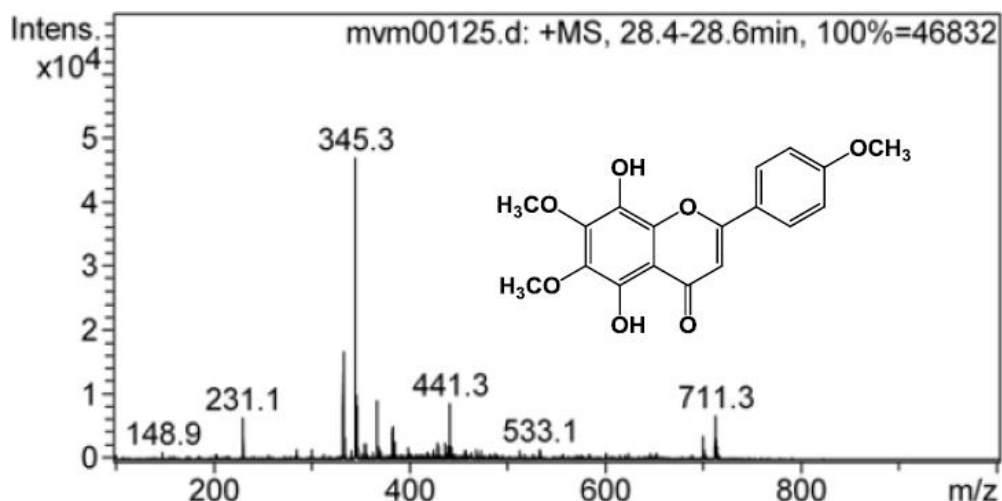
TR= 27.6 min, 3.54 % área relativa, M<sup>+</sup> + Na 418+23 C<sub>21</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>

**Pico 14 flavonoide no identificado**



TR= 28.1 min, 0.69 % área relativa, M<sup>+</sup> +H= 333, C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>8</sub>

**Pico 16 8-hidroxisalvigenina**



TR= 28.5 min, 5.64 % área relativa,  $M^+ + H = 345$ ,  $C_{18}H_{16}O_7$

Una alícuota del extracto acuoso fue analizado por CLAE, en un cromatógrafo equipado con un detector de índice de refracción, utilizando una columna Zorbax carbohydrate, de 15 cm × 4.6 mm de diámetro y tamaño de partícula de 5 µm, con a temperatura de 35°C, empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo/agua 80:20 como fase móvil con un flujo de 1.4 mL/min. De este análisis se identificaron los azúcares que se muestran en la siguiente tabla:

Pico	Tiempo de retención (min)	compuesto	% de área relativa
1	3.050	xilosa	18.21
2	3.667	fructosa	36.25
3	4.067	glucosa	9.80
4	4.350	No identificado	7.28
5	6.433	sacarosa	19.10
6	7.550	maltosa	9.33
% total			90.77

***Agastache mexicana* subespecie *mexicana* "toronjil morado"**

***Extracto de hexano (20 g, 2.0 %).***

Las fracciones eluidas con hexano, mostraron un perfil complejo en ccf, por lo que se analizaron por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas. La identidad de los constituyentes se realizó por comparación de sus tiempos de retención con los de compuestos estándar disponibles, así como por comparación de los patrones de fragmentación se sus espectros de masas con los datos descritos en la literatura (Masada, 1976) y los datos proporcionados por la biblioteca del equipo (National Institute of Standards and Technology NIST 3.0). Adicionalmente, la identidad de los compuestos fue confirmada, calculando los índices de Kovats, utilizando como estándar una mezcla de n-alcanos de 12 C a 22 C y comparando los índices de retención (IR) de cada uno de los compuestos con los descritos en la literatura (Van den Dool and Kratz, 1963; Davies, 1990). Los resultados de estas fracciones se muestran en la siguiente tabla:

Aceites esenciales de las partes aéreas de *A. mexicana* subesp. *mexicana* "toronjil morado"

	<b>producto</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Índice de retención (min)</b>	<b>% de abundancia</b>
1	Éster 3-hexenil del ácido butanoico	10.82	988	16.88
2	metilchavicol	11.00	1031	56.56

3	2,6-dimetil-4(2-propenil).fenol,	16.43	1364	0.23
4	3-metoxi-cinamaldehido	17.91	1451	1.03
5	9-eicosano	20.72		
6	6-octen-1-ol,3,7-dimetil,propionato	21.30	1657	0.11
7	Ácido hexadecanoico	23.66	1801	17.71
8	Ácido9-hexadecanóico	25.69	1924	0.66
9	Ácido oleanóico	25.88	1936	1.12
10	dioctil éster hexadecanóico	28.19	2120	0.11
Total de identificados				95.75

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (10/90) se obtuvieron 97 mg de  **$\beta$ -sitosterol (1)**.

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (20/80) se aisló por precipitación 105 mg de una mezcla de ácido oleanóico y **ácido ursólico (2)**.

De las fracciones eluidas con hexano/acetato de etilo (30/70), se aislaron por recristalización el 54 mg de **ácido maslínico (20)** y 32 mg **ácido corosólico (18)**.

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

Extracto de acetato de etilo (18 g, 1.8 %).

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (20/80) se aisló por precipitación 102mg (0.1 %) de ácido ursólico.

Las aguas madres de estas fracciones se recromatografiaron, mediante una columna relámpago, utilizando como sistema de elución, una mezcla de

hexano/acetato de etilo (30/70), A partir de esta columna se aislaron 53 mg de **salvigenina (22)**, como un sólido cristalino amarillo, con pf= 180-182 °C

EM:  $[M^+]$  a  $m/z = 328$  requiere una fórmula molecular  $C_{18}H_{16}O_6$ .

RMN  $^1H$ : (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) ( $J$ , multiplicidad,  $J$ , asignación): 6.59 (1H, s, H-3), 7.84 (2H, d, H-2' y H-6'), 7.01 (2H, d, H-3' y H-5'), 6.54 (1H, s, H-8), 3.97, 3.92, 3.89, (9H, s, H de  $-OCH_3$ , en las posiciones, 7, 6, y 4').

De esta misma columna se aislaron 125 mg de **acacetina (11)** y **20 mg de 5-hidroxi 7, 4'-dimetoxiflavona (21)**, como un sólido cristalino amarillo pálido con pf= 168-170 °C, el cual fue identificado por comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas con las descritas en la literatura, descritas a continuación.

RMN  $^1H$ : (400 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) ( $J$ , multiplicidad,  $J$ , asignación): 12.81 (1H, s, OH-C-5), 7.82 (2H, d de un sistema AA'BB',  $J = 9.2$ , H-2' y 6'), 7.00 (2H, d de un sistema AA'BB',  $J = 9.2$ , H-3' y H-5'), 6.56 (1H, s, H-3), 6.46 (1H, d, de un sistema ABX,  $J = 2.0$ , H-6), 6.35 (1H, d, del sistema ABX,  $J = 2.0$ , H-8), 3.88 (3H, s,  $-OCH_3$  C-4') y 3.87 (3H, s,  $-OCH_3$  C-7).

De las fracciones eluidas con hexano/acetato de etilo (40/60) se aislaron 300 mg de una mezcla de **ácido maslínico (20)** y **ácido corosólico (18)**.

De las fracciones eluidas con acetato de etilo se aislaron 205 mg de **7-O-glucosil-acacetina (15)**.

**Extracto de metanol (60 g, 6.0 %).**

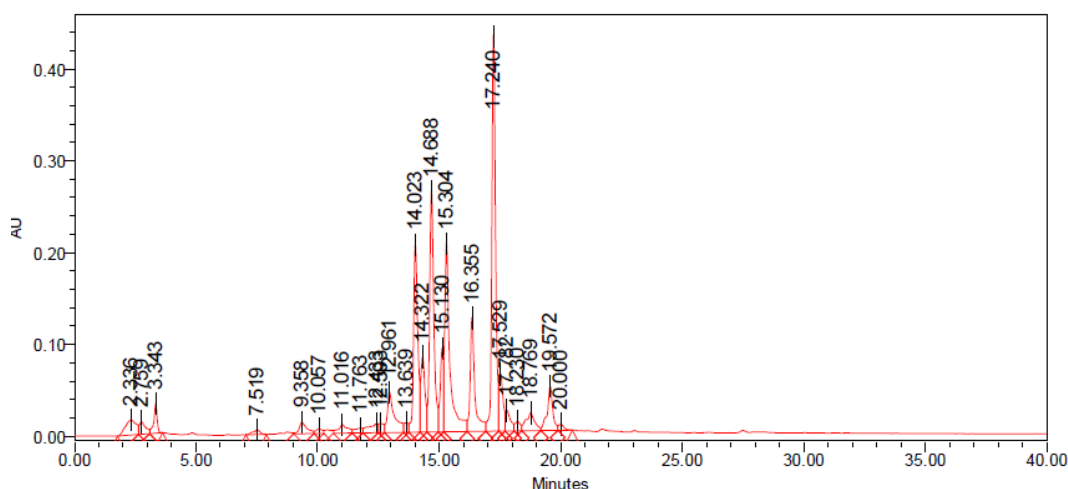
Del extracto de metanol se aisló por precipitación un sólido blanco amorfo, que resultó ser una mezcla de tres productos de tipo flavonoide, los

cuales fueron purificados mediante una columna de cromatografía al vacío, utilizando como eluyente mezclas de AcOEt- MeOH, H<sub>2</sub>O (80/18/2), de la cual se aislaron por cristalización 150 mg de **7-O-glucosilacetina**, **325 mg de (2''acetil)-7-O-glucosil acetina (16)**.

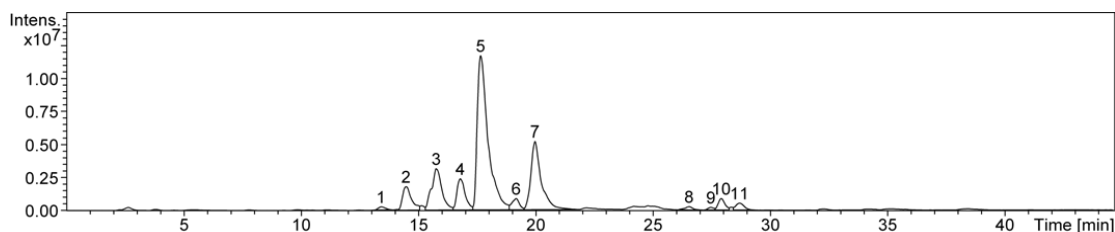
Finalmente de las fracciones de mayor polaridad de aislo por precipitación con acetona 326 mg de **glucosa** como un sólido blanco.

Análisis del extracto acuoso de *Agastache mexicana* subesp. *mexicana*, mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia acoplado a un Espectrómetro de Masas con re-arreglo de diodos y Trampa de Iones (CLAE-

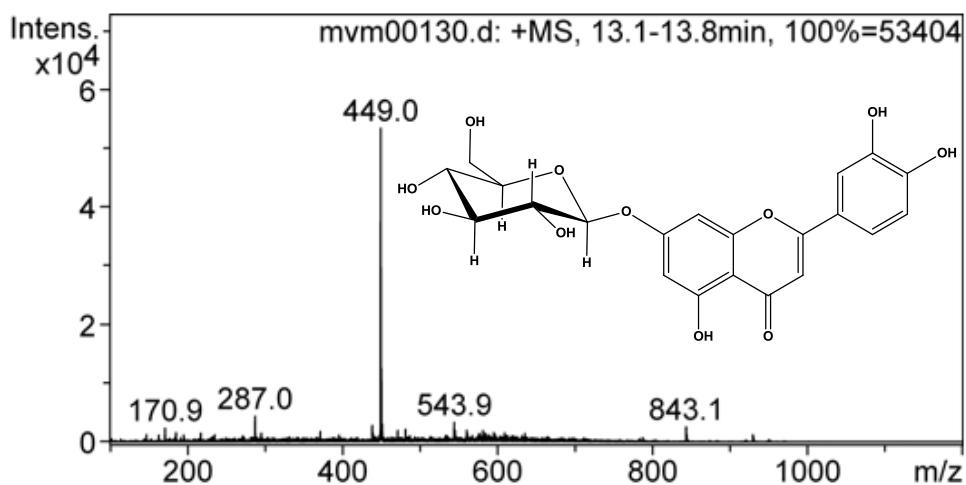
EM-TI). Perfil por CLAE



Espectros de masas



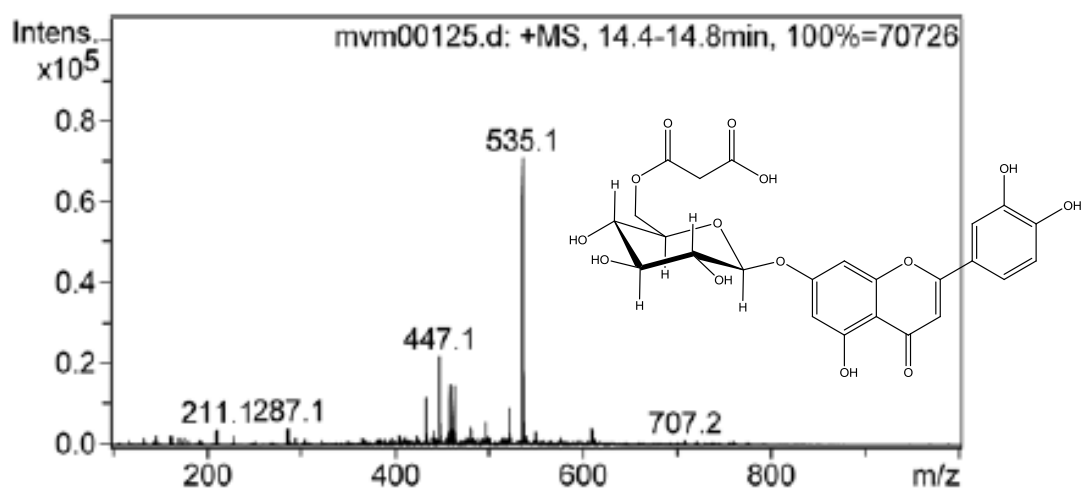
**Pico 1 7-O-β-glucósido de**



**luteolina**

TR= 13.4 min, C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>

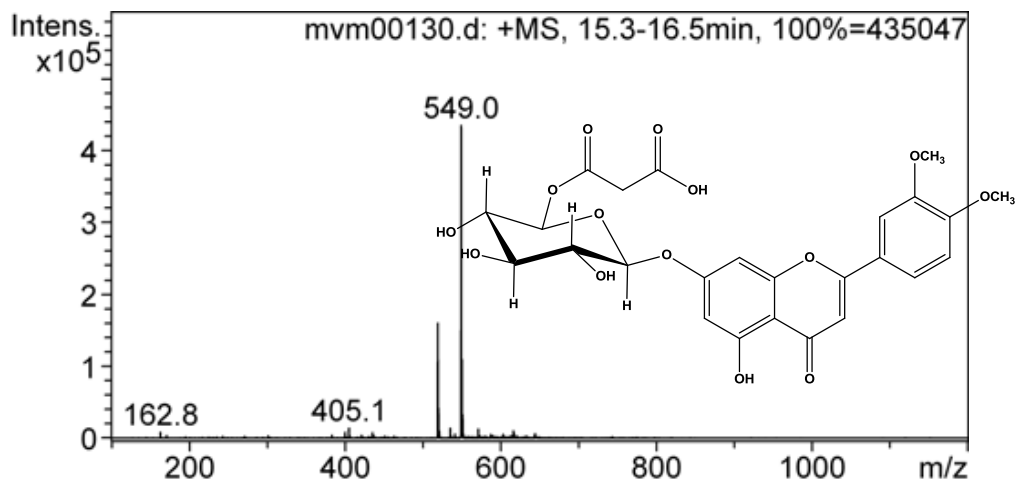
**Pico 2 7-O-β-D-glucosil-(6''malonil) acetina**



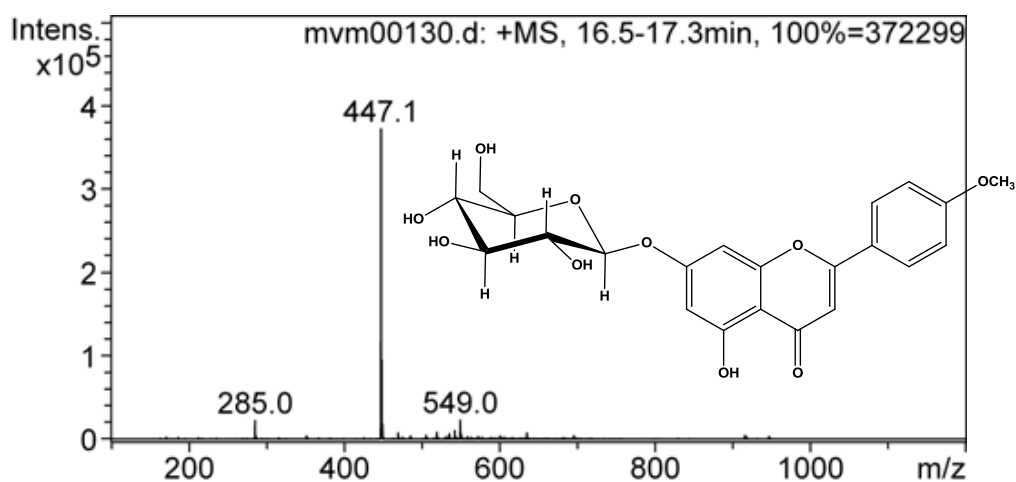
TR

= 14.5, C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>O<sub>14</sub>

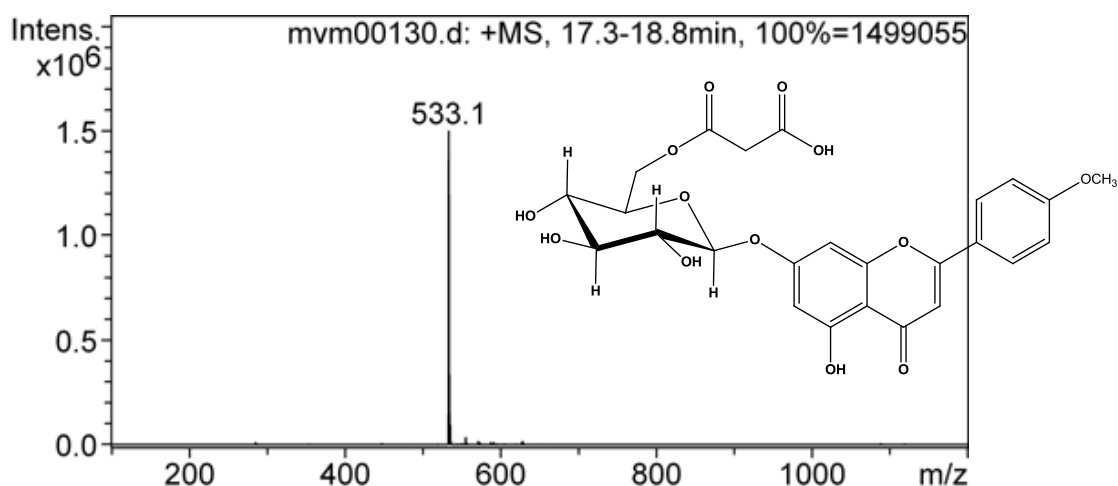
**Pico 3 7-O-β-glucosil (6''-O-malonil)-3' metoxi- acetina**



**Pico 4 7-O-β- glucosil acetina**



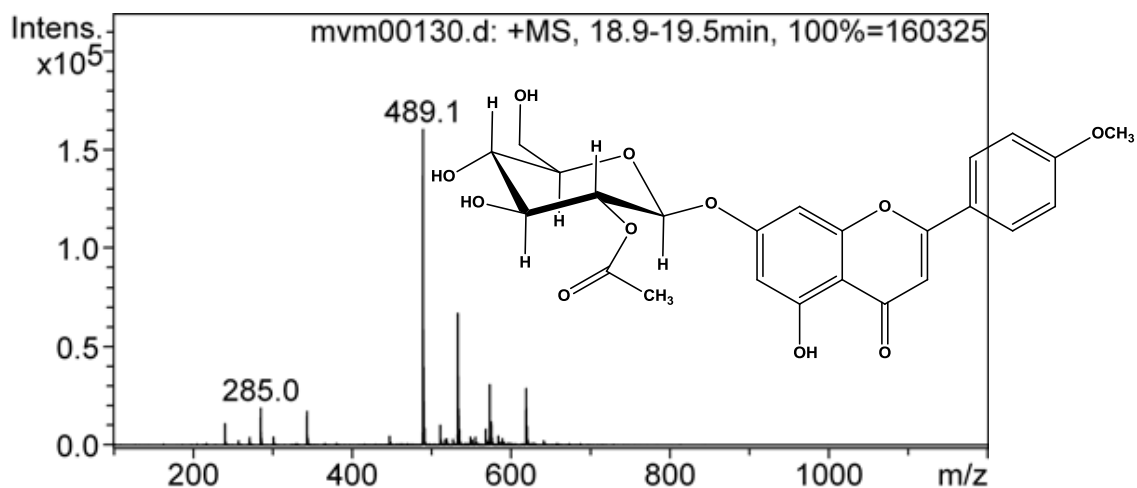
**Pico 5 7- O-β-glucosil-D-(6''-O-malonil)-acetina,**



TR= 17.6 min, C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>13</sub>

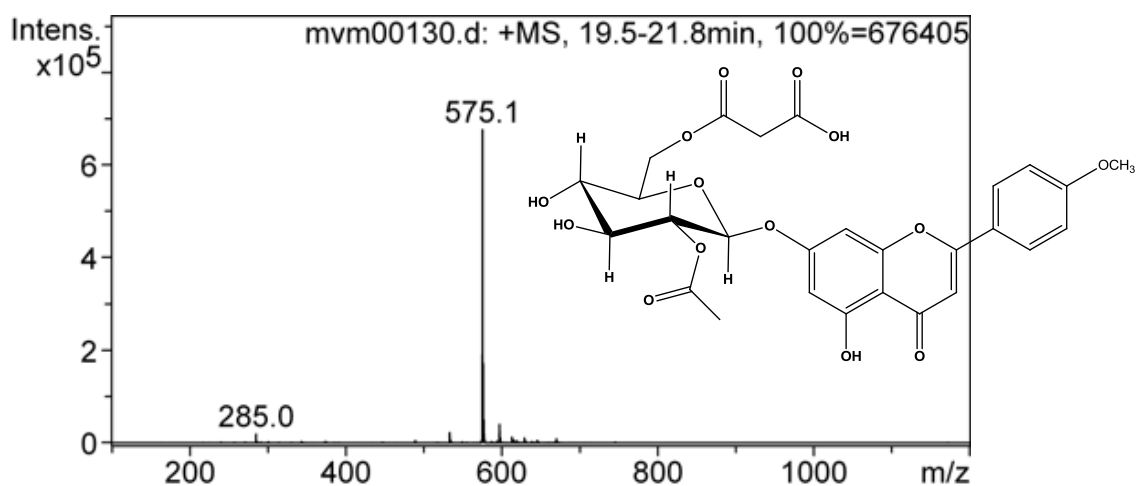
**Pico 6 7-O-β-glucosil-D-(2'' acetil)-acetina**





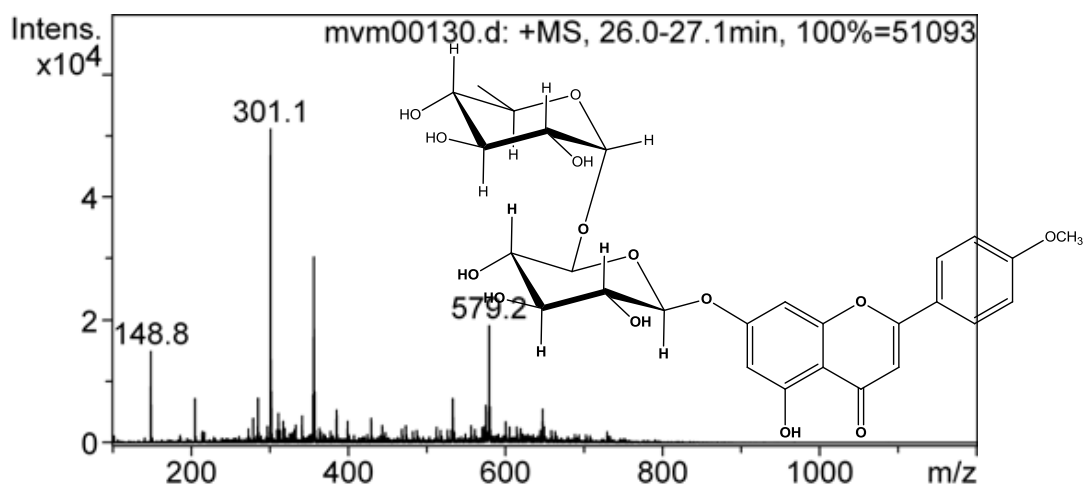
TR= 19.2 min, C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub>

**Pico 7 7-O-β-glucosil-D-(2'' acetil-6'' malonil)- acetina,**



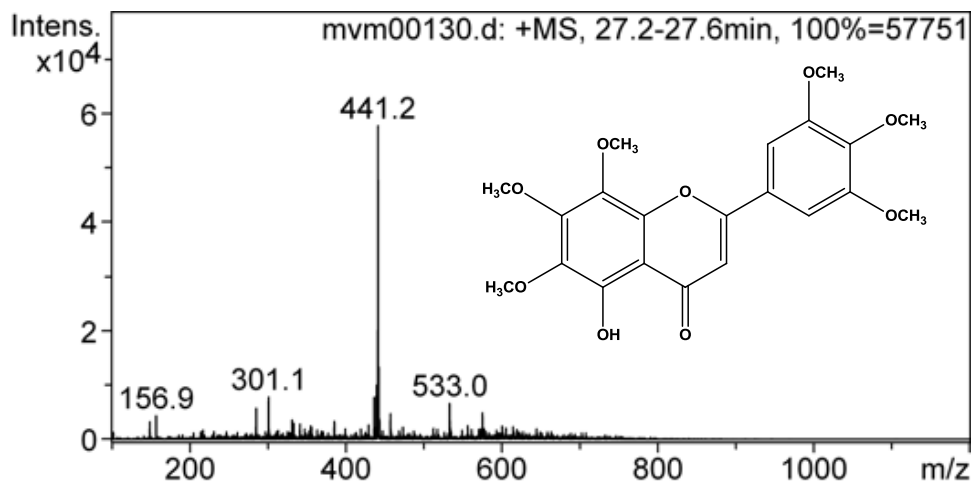
TR= 19.2 min, C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>O<sub>14</sub>

**Pico 8 7-O-β-glucosil-D-(6'' ramnosa)-acetina**



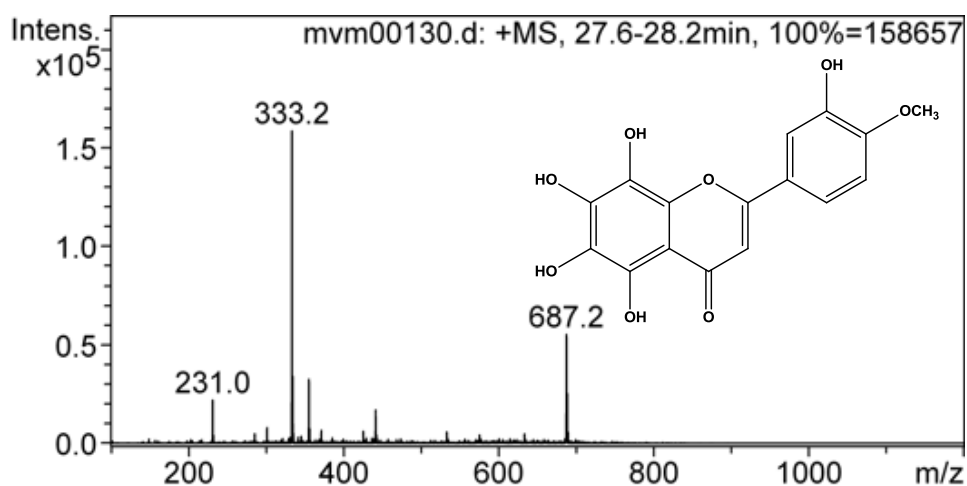
TR= 26.5 min, C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>

**Pico 9 Gardenina A + Na**



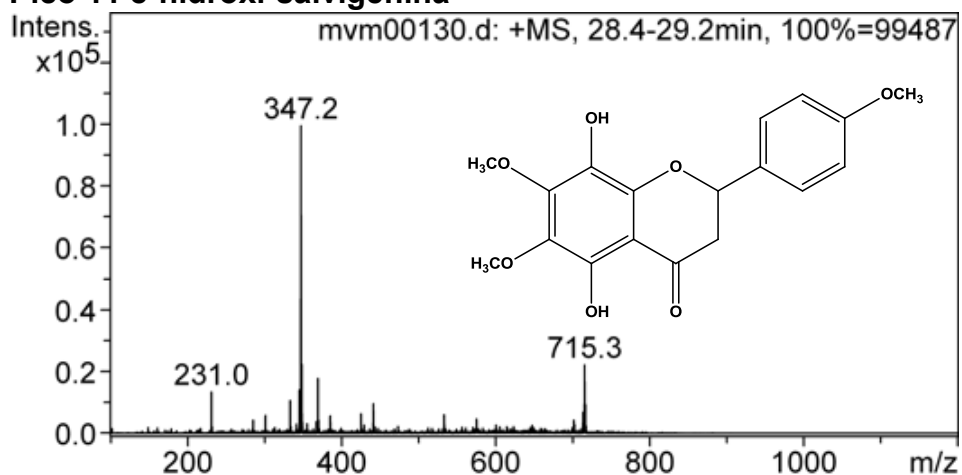
TR= 27.5 min, C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>

**Pico 10 5,6,7,8,3'-pentahidroxi, 4'-metoxiflavona**



TR= 27.9 min, C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>8</sub>

**Pico 11 8-hidroxi-salvigenina**



TR= 28.7 min, C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>

***Agastache mexicana* suesp. *xolocotziana* “Toronjil blanco”**

***Extracto de hexano***

Las fracciones eluidas con hexano, mostraron un perfil complejo en ccf, por lo que se analizaron por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas. Estas fracciones fueron analizadas siguiendo el método antes descrito para las fracciones no polares de *A. mexicana* subespecie *mexicana*. En la siguiente tabla se muestran los resultados de este análisis.

Productos de las fracciones no polares de *A. mexicana* subesp. *xolocotziana*.

producto	Tiempo de retención (min)	Índice de retención (min)	% de abundancia	
1	no identificado	3.53	577	0.72
2	9-octadecino	5.54	699	0.16
3	camfor	5.86	719	0.14
4	no identificado	6.88	781	2.17
5	p-menten-2,8-diol	7.36	810	0.39
6	2-hidroxi-6-metoxiacetofenona	8.20	861	0.84
7	$\alpha$ -terpineol	9.16	919	0.50
8	no identificado	9.74	955	0.28
9	ácido butanoico	9.96	968	0.31
10	isopiperitenona	10.26	986	0.31
11	geraniol	11.11	1038	2.87
12	metil éster de $\alpha$ -terpineol	11.65	1071	4.39
11	no identificado	11.84	1082	0.24
12	terpin p-mentan-1,8-diol	12.05	1095	0.41
13	no identificado	12.25	1107	5.52
14	<b>pulegona</b>	12.32	1111	10.16
15	no identificado	12.45	1119	0.18
16	no identificado	13.17	1163	0.12
17	acetate de nerilo	13.22	1166	0.60
18	no identificado	13.45	1180	0.32
19	3,3,6-trimetil, 1,5-heptadieno	13.78	1200	0.57
20	acetate de timol	13.91	1208	1.11
21	piperitona	14.55	1247	3.39
22	<b>nerol</b>	14.75	1259	20.11
23	p-2-menten-1,8-diol	14.78	1261	1.76
24	isoeugenol	15.06	1278	0.49
25	diosfenol	15.43	1300	2.02
26	acetate de $\beta$ -terpinilo	15.71	1317	2.54
27	ocimenol	16.47	1364	3.14
28	p-ment-3-en-5ona, 2,8-dihidroxi-	16.73	1379	0.16
29	no identificado	16.96	1393	5.21
30	2-pentadecanona	17.58	1431	2.2
31	p-menth-1-en-7,8-diol	18.04	1459	1.14
32	3,7-óxido de linalool	18.55	1490	0.14
33	no identificado	20.24	1593	0.56
34	éster metílico del ácido hexadecanoico	22.45	1727	5.56
35	ácido oleico	23.33	1781	4.76
36	palmitato de etilo	24.58	1857	0.41
<b>Total de identificados</b>				71.14
<b>Total detectados</b>				86.90
dodecano			1200	
pentadecano			1500	
hexadecano			1600	
octadecano			1800	
eicosano			2000	

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (10/90) se obtuvieron por recristalización 62 mg de  **$\beta$ -amirina (23)**, como un sólido blanco cristalino, con  $pf = 163-167\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

EM:  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ , 426 [M<sup>+</sup>] (8), 411 (3), 218 (100), 207 (6), 205 (4), 203 (42), 189 (13), 133 (8).

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt (20/80) se aislaron por precipitación 221 mg de **ácido ursólico (2)**.

#### ***Extracto de acetato de etilo***

De las fracciones eluidas con hexano/acetato de etilo (80/20), aislaron por precipitación 112 mg de **ácido ursólico (2)**.

Las aguas madres de estas fracciones se recromatografiaron en columna relámpago, utilizando como sistema de elusión una mezcla de hexano-acetato de etilo (80/20). De esta columna se aislaron 95 mg de **acacetina (11)**.

De esta misma polaridad se aislaron 49 mg de **salvigenina (22)**.

De las fracciones eluidas con hexano acetato de etilo (60/40) se aislaron 104 mg de **pilosina (5,7,8-trihidroxi- 6,4'-dimetoxiflavona)(24)** como un sólido verdoso cristalino, con  $pf = 184-186\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la identidad de este producto está de acuerdo con los datos físicos y espectroscópicos descritos en la literatura (Grayer y cols., 2001).

EM:  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$  requiere un [M<sup>+</sup>] a  $m/z = 330$  (100), 315 (95), 297 (18).

RMN <sup>1</sup>H: (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm) (J, multiplicidad, J, asignación): 12.44 (1H, s, OH-C-4), 10.39 y 9.27 (2H dos s, OH, C-7 y 8), 8.01 (2H, d de un sistema AA'BB', J= 8.8, H-2' y 6'), 6.92 (2H, d, sistema AA'BB', J = 8.6, H-3' y 5') 6.82 (1H, s, H-3), 3.92 (3H, s 4-OCH<sub>3</sub>), 3.80 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>).

RMN  $^{13}\text{C}$ : (50 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm) (asignación): 182.75 (C-4), 164.14 (C-2), 161.31 (C-4'), 147.97 (C-5), 130.61 (C-6), 128.46 (C-2', 6'), 121.17 (C-1'), 115.91 (C-3', 5'), 106.36 (C-10), 102.42 (C-3), 61.16 (6-OCH $_3$ ) y 60.49 (4'-OCH $_3$ ).

### **Extracto de metanol**

De las fracciones eluidas con acetato de etilo-hexano (80/20), se aislaron 50 mg de **daucosterol (14)**.

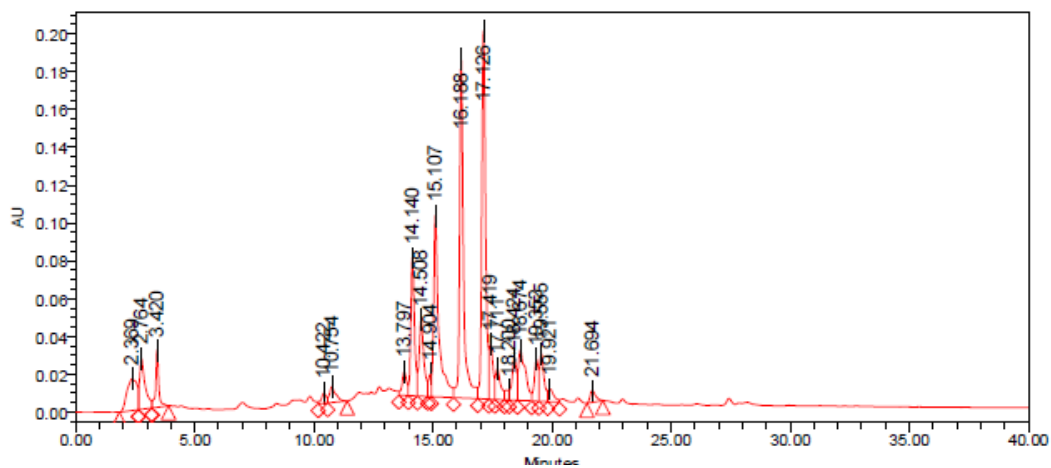
De las fracciones eluidas con acetato de etilo se aislaron por precipitación 960 mg de un sólido amorfo amarillo, cuyo perfil en ccf mostró la presencia de dos productos de tipo flavonoide, ésta mezcla se separó por cromatografía relámpago, utilizando como sistema de elución una mezcla de acetato de etilo-hexano-MeOH (80/10/10).

A partir de la cual se aislaron 225 mg de **7-O-glucosilacetina (15)** y 123 mg de **(2''acetil)-7-O- glucosilacetina (16)**.

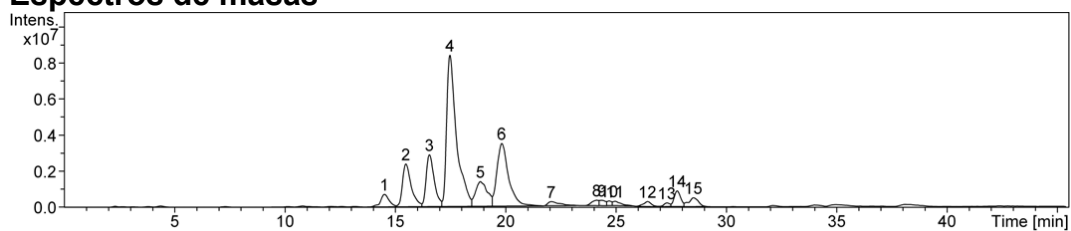
De las fracciones de mayor polaridad se aislaron por precipitación con acetona, 325 mg de **sacarosa** como un sólido blanco cristalino, con punto de descomposición de 183 °C.

Análisis del extracto acuoso de *Agastache mexicana* subespecie *xolocotziana*, mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia acoplado a un Espectrómetro de Masas con re-arreglo de diodos y Trampa de Iones (CLAE-EM-TI).

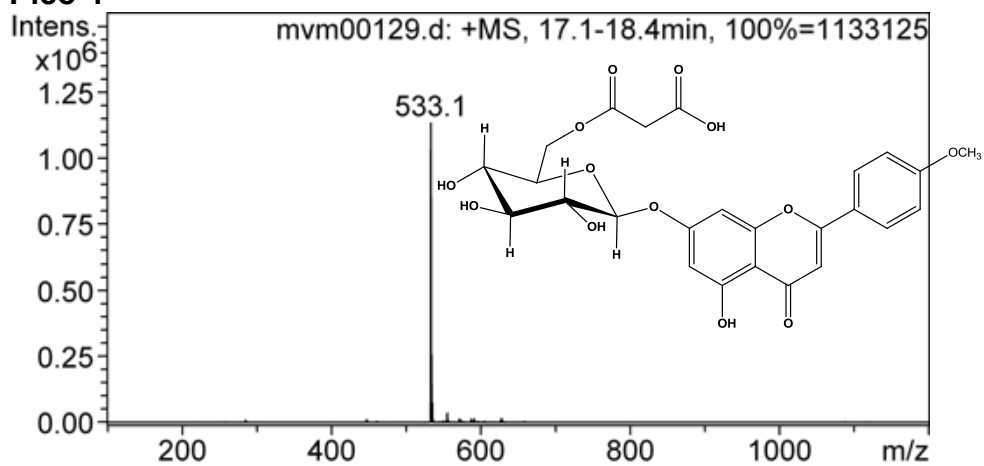
Perfil por CLAE.



**Espectros de masas**

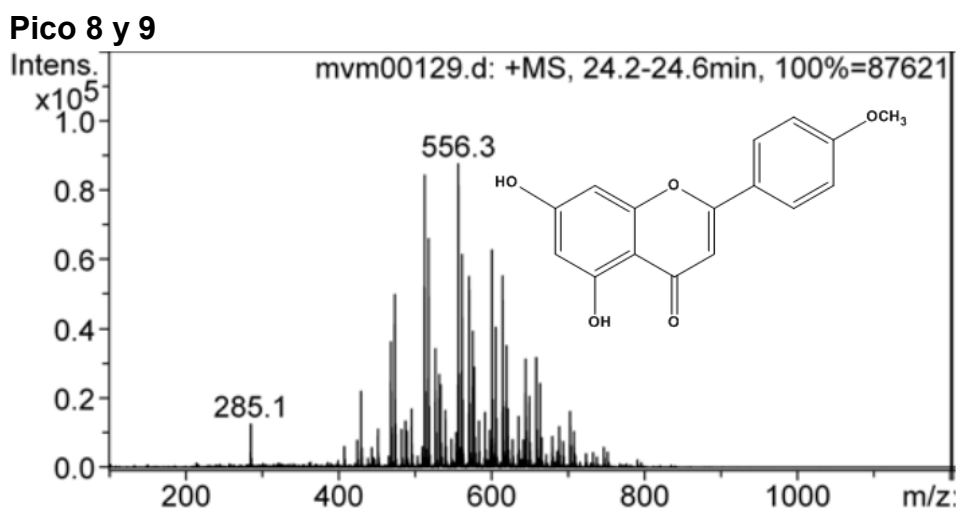
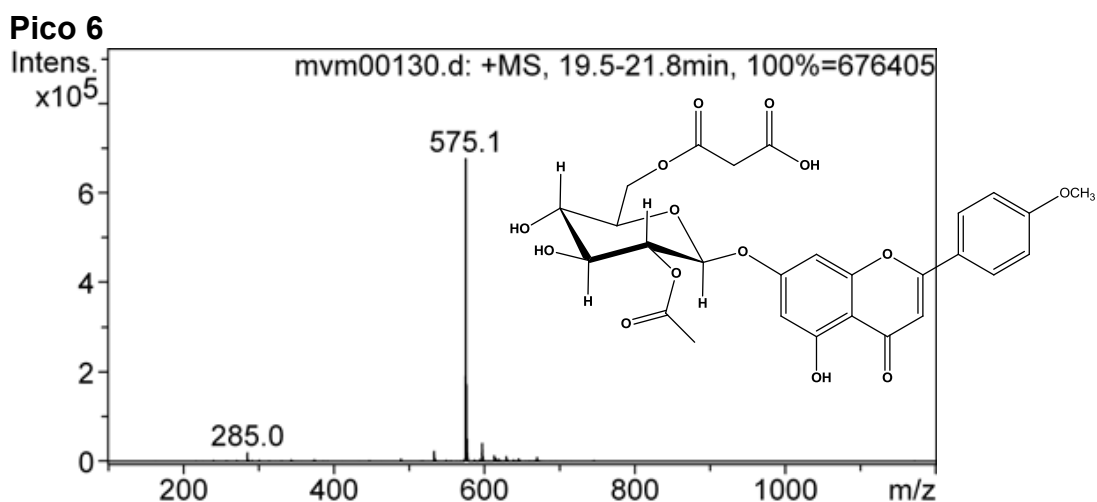
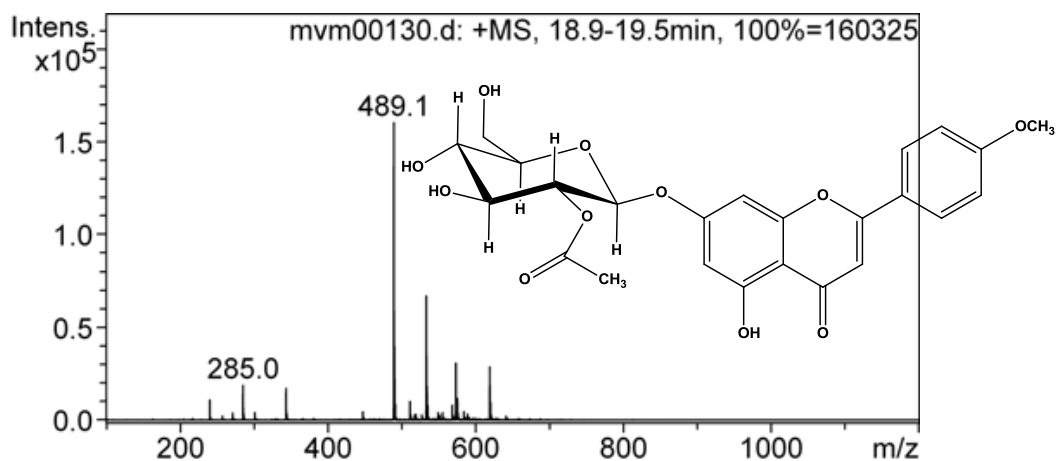


**Pico 4**



7-O-β-glucosil-D-(6''-O-malonil)-acetina, TR= 17.5 min, C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>13</sub>

**Pico 5**



Acetina TR= 24.1 y 24.3 min, C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> en ambos espectros se observa la presencia abundante de ceras o grasa



## *Publicaciones*

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Biochemical Systematics and Ecology 32 (2004) 685–694

[www.elsevier.com/locate/biochemsyseco](http://www.elsevier.com/locate/biochemsyseco)


---

 biochemical  
 systematics  
 and ecology
 

---

## Comparative chemical composition of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*

Rosa Estrada-Reyes<sup>a</sup>, Eva Aguirre Hernández<sup>c</sup>,  
 Aída García-Argáez<sup>b</sup>, Marcos Soto Hernández<sup>c</sup>,  
 Edelmira Linares<sup>d</sup>, Robert Bye<sup>d</sup>, Gerardo Heinze<sup>a</sup>,  
 Mariano Martínez-Vázquez<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratorio de Fitofarmacología, Instituto Mexicano de Psiquiatría, Calz. México-Xochimilco No. 101, Tlalpan, C. P. 14370, Mexico, D. F.*

<sup>b</sup> *Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, C. P. 04510, Mexico D. F.*

<sup>c</sup> *Colegio de Postgraduados, Instituto de Recursos Naturales, Especialidad de Botánica, C. P. 5630 Montecillo, Estado de Mexico*

<sup>d</sup> *Jardín Botánico del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, C. P. 04510, Mexico D. F.*

<sup>e</sup> *Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, C. P. 04510, Mexico, D. F.*

Received 29 January 2003; accepted 9 January 2004

---

### Abstract

A comparative chemical analysis of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana* reveals that their methanol extracts constituents were very similar, with acacetin and (2-acetyl)-7-O-glucosyl acacetin being the most abundant compounds obtained. These results are consistent with the information reported for other species of *Agastache*. However, GS-MS analyses showed that methyl chavicol, limonene and linalool were the main constituents of the essential oils of *A. mexicana* subsp. *mexicana*, while pulegone, menthone and isopulegone were the major constituents found in *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*. Furthermore, a different composition was found in their respective hexane extracts. These chemical composition dissimilarities between the two taxa support their recognition as distinct subspecies.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

---

\* Corresponding author. Tel.: +52-56-16-25-76; fax: +52-56-16-22-03.

E-mail address: [marvaz@servidor.unam.mx](mailto:marvaz@servidor.unam.mx) (M. Martínez-Vázquez).

0305-1978/\$ - see front matter © 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.  
 doi:10.1016/j.bse.2004.01.005

## 1. Introduction

The genus *Agastache* (Lamiaceae) consists of about 20 species distributed in Asia and North America, 12 of these are endemic to Mexico (Sanders, 1987).

*Agastache mexicana* has been divided in two subspecies: *A. mexicana* (H. B. K.) Lint & Epling subsp. *mexicana* Bye, Linares & Ramamoorthy, and *A. mexicana* (H. B. K.) Lint & Epling subsp. *xolocotziana* Bye, Linares & Ramamoorthy, known in traditional medicine as “toronjil morado” and “toronjil blanco”, respectively (Bye et al., 1987). The infusion of both plants, along with *Dracocephalum moldavica* L., also known as “toronjil azul”, forms the medicinal plant complex named “los tres toronjiles”, which is commonly used for the treatment of various gastrointestinal, nervous, and cardiovascular ailments (Linares et al., 1988, 1995), as well as culturally defined illnesses, such as “espanto” and “susto” (Argueta et al., 1994). Although the classification of these subspecies was based mainly on morphological differences, Bye et al. (1987) noted that while *A. mexicana* subsp. *xolocotziana* shares some common chemical constituents with *A. mexicana* subsp. *mexicana*, it also produces breviflorine, a clerodane type diterpene, chrysin and pratol flavonoids, and an essential oil mainly formed of bornyl acetate. However, an extensive bibliography review indicates that the genus *Agastache* is chemically defined mainly by the presence of methyl chavicol, estragole and limonene in its essential oils (Fuentes-Granados et al., 1998 and the reference cited here in, Xuan-Dung et al., 1996; Fuentes-Granados et al., 2000; Hegnauer, 1973; Lognay et al., 2002) and by flavonoids derived from 4',5,7-trihydroxy flavone in its polar constituents (Chang-Hung et al., 1979; Sanders et al., 1980; Exner et al., 1981; Itokawa et al., 1981; Barberán, 1986; Barberán and Gill, 1992). Interestingly, from a previous analysis of *A. mexicana*, pulegone and menthone were identified as major constituents of its essential oils. However, the authors do not specify which taxa they studied (Manjarrez and Mendoza, 1966). The atypical composition of *A. mexicana* subsp. *xolocotziana* prompted us to re-study both taxa.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material

Flowers of the spontaneous race (*A. mexicana* subsp. *mexicana*) and the cultivated race (*A. mexicana* subsp. *xolocotziana*) were both collected in the neighborhood of San José Tlacotitlán Ozumba, Edo. de México in August 2000. They were identified by botanists, Bye and Linares. Voucher samples of each taxa were deposited at the Herbario Nacional del Instituto de Biología, UNAM. [*A. mexicana* (H. B. K.) Lint & Epling subsp. *mexicana* Bye, Linares & Ramamoorthy,



1120 and *A. mexicana* (H. B. K.) Lint & Epling subsp. *xolocotziana* Bye, Linares & Ramamoorthy 1121].

## 2.2. Analysis of essential oil

Flowers of both taxa were kept on ice until the chemical analyses were carried out. The essential oils from each sample of *Agastache* (100 g) were obtained by means of hydrodistillation for 3 h in a modified Clevenger type apparatus. The oils were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and stored under refrigeration. Analyses of the essential oils were carried out by GC-MS using a JMS-AX505HA (JEOL) mass spectrometer coupled to a GC Hewlett Packard 5890 Series II instrument equipped with an ultra 2 (crosslinked 5% PhMe silicone) capillary column (25 m × 20 mm i. d. × 0.33 μm film thickness). The temperature of the ion source was 300 °C. The accelerating and ionizing potentials were 3 kV and 70 eV, respectively. The GC oven temperature was programmed as follows: initial temperature 40 °C (1 min) followed by a temperature increase of 7 °C per min up to 300 °C. The quantification of the components was performed on the basis of their GC peak areas, without correction for response factors. The constituents were identified by comparing their retention times to those of standard compounds, peak enrichment by co-injection with standards wherever possible (pulegone, anisole, limonene, Chem Service, West, PA 19381, USA), as well as by comparison of their MS spectra with the data reported in literature (Masada, 1976), and library of National Institute of Standards and Technology (NIST 3.0) data. Kovat's index were calculated using a standard mixture of C<sub>12</sub>-C<sub>22</sub> *n*-alkanes (Chem Service, West, PA 19381, USA), and comparing the results with the data reported in literature (Van den Dool and Kratz, 1963; Davies, 1990).

## 2.3. Analysis of hexane, EtOAc and MeOH extracts

Dried, ground flowers of *A. mexicana* subsp. *mexicana* (710 g) and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana* (225 g) were extracted with hexane, EtOAc and methanol successively. The evaporation of the solvents under vacuum afforded the respective extract, which was chemically analyzed by chromatography column (CC).

The CC were performed using an open column packed with silica gel 60 GF<sub>254</sub> Merck in the proportion of 1:15 in respect of the extract. In all the cases, the elution started with hexane followed by hexane-EtOAc mixtures, EtOAc, EtOAc-MeOH mixtures, and ended with MeOH.

### 2.3.1. *A. mexicana* subsp. *mexicana*

The hexane extract (14.28 g, 2.01% w/w with respect to dried material plant) was analyzed by GC-MS under the experimental conditions previously stated for the essential oil analysis. It was also analyzed by CC.

The EtOAc extract (16.77 g, 2.36%) was separated by CC. Fractions of 100 ml were collected and those with similar TLC profile were combined. A total of 131 fractions was obtained. An amorphous solid was obtained from the fractions eluted with hexane-EtOAc (8:2) mixtures, (4.07 g, 0.57%). A part of this solid

(600 mg) was treated with an ethereal solution of diazomethane and the mixture of this reaction was submitted to a CC.

The methanol extract (72.22 g, 10.17%) was fractionated by CC. A total of 116 fractions was obtained.

### 2.3.2. *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*

The hexane extract (3.03, 1.34%) was analyzed by GC-MS under the same conditions as stated for the essential oil analysis. This extract also was analyzed by CC.

The EtOAc extract (6.26 g, 2.78%) was chromatographed, and from the initial fractions an amorphous yellow solid was isolated (965 mg). It was treated with an ethereal solution of diazomethane, the reaction mixture was separated by CC. The methanol extract (25.80 g, 11.46%) was fractionated by CC. A total of 31 fractions were obtained. From the fractions eluted with hexane-EtOAc (7:3) mixtures a yellow solid was isolated, which was purified by crystallization methods.

## 3. Results

### 3.1. Analysis of essential oil

The yields of essential oils were 1.2 and 0.9% for *A. mexicana* subsp. *mexicana* and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*, respectively.

The results of the chemical analyses of the essential oils are shown in Table 1. *A. mexicana* subsp. *mexicana* afforded methyl chavicol (86.78%) and limonene (11.24%) as main compounds, while pulegone (80.07%) and limonene (9.49%) were detected as the main compounds in *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*.

### 3.2. Analysis of hexane, EtOAc and MeOH extracts

#### 3.2.1. *A. mexicana* subsp. *mexicana*

The results of the hexane extract GS-MS analyses showed the presence of 11 compounds. Methyl chavicol (56.56%) was the major compound (Table 2).

Table 1  
Constituents of essential oils of *A. mexicana* subsp. *mexicana* (1) and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana* (2)

Compound	1 abundance (%)	2 abundance (%)	Retention time (min)	Retention index (min)
Limonene <sup>b</sup>	11.24	9.49	8.31	868
Linalool	1.98	–	9.5	940
Mentone	–	7.91	10.25	986
Isopulegone	–	2.53	10.69	1012
Methyl chavicol <sup>a</sup>	86.78	–	11.00	1031
Pulegone <sup>a,b</sup>	–	80.07	12.25	1107

Identification of constituents was based on mass spectral fragmentation using the mass spectra library of National Institute of Standards and Technology (NIST 3.0).

<sup>a</sup> Also isolated from hexane extract and identified by RMN <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C data.

<sup>b</sup> Co-injection with the respective standard.



Table 2  
Constituents of the hexane extract of *A. mexicana* subsp. *mexicana* determinate by GC-MS methods

Compound	Abundance (%)	Retention time (min)	Retention index (min)
Butanoic acid, 3-hexenyl ester	16.88	10.82	988
Methyl chavicol <sup>a</sup>	56.56	11.00	1031
2,6-Dimethoxy-4-(2-propenyl)-phenol	0.23	16.48	1364
3-Methoxy-cinnamaldehyde	1.34	17.91	1451
9-Eicosyne	1.03	20.72	1622
6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl, propionate	0.11	21.30	1657
Hexadecanoic acid	17.71	23.66	1801
9-Hexadecenoic acid	0.66	25.69	1924
Oleanoic acid	1.12	25.88	1936
Hexanedioc, dioctyl ester	0.11	28.19	2120
Total identified	95.75		

Identification of constituents was based on mass spectral fragmentation using the mass spectra library of National Institute of Standards and Technology (NIST 3.0).

<sup>a</sup> Isolated from hexane extract and identified by RMN <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C data.

Furthermore, methyl chavicol was isolated from the hexane extract by CC and it was identified by comparison of its spectral data with those reported in the literature (Aldrich Library, 1983).

From the EtOAc extract, an amorphous solid which was submitted to a diazomethane reaction was isolated. From this reaction, the methyl ester of ursolic acid (125 mg), 5-hydroxy-7,4' dimethoxy flavone (43 mg) and salvigenine (4 mg) were obtained. The identification of these compounds was achieved by comparison of their physical and spectral data with those reported in literature (Lewis and Tucker, 1983; Vigar and Rahman, 1994; Youssef and Frahm, 1995; Kamaya et al., 1996).

From the methanol extract, acacetin (43 mg), (2-acetyl)-7-O-gucosyl acacetin (63 mg), and 7-O-glucosyl acacetin (85 mg) were isolated. The identification of these compounds was achieved by the comparison of the physical and spectral data with those reported in literature and by the synthesis of their respective peracetate derivatives (Itokawa et al., 1981).

### 3.3. *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*

Table 3 shows the components of the hexane extract whose composition was determined by GS-MS. Accordingly, 28 compounds were identified in the extract, most of them were mono sesquiterpenes, including nerol (20.11%), and pulegone (10.16%) as the major terpenic constituents. Fatty acids, such as oleic acid (4.76%) were also detected. Pulegone was isolated from hexane extract by CC and it was identified by comparison of its spectral data with those reported in the literature (Aldrich Library, 1993).

From the EtOAc extract, an amorphous solid which was submitted to a diazomethane reaction was isolated. From this reaction, the methyl ester of ursolic

Table 3  
Constituents of the hexane extract of *A. mexicana* subsp. *xolocotziana* determinate by GC-MS methods

Compound	Abundance (%)	Retention time (min)	Retention index (min)
n.d.	0.72	3.53	577
9-octadecyne	0.16	5.54	699
Camphor	0.14	5.86	719
n.d.	2.17	6.88	781
p-menth-6-ene-2,8-diol	0.39	7.36	810
2-hydroxy-6-methoxyacetophenone	0.84	8.20	861
$\alpha$ -terpineol	0.50	9.16	919
n.d.	0.28	9.74	955
Butanoic acid	0.31	9.96	968
Isopiperitona	0.31	10.26	986
Geraniol	2.87	11.11	1038
$\alpha$ -terpineol-methyl ether	4.39	11.65	1071
n.d.	0.24	11.84	1082
Terpin p-menthane-1,8-diol	0.41	12.05	1095
n.d.	5.52	12.25	1107
Pulegone	10.16	12.32	1111
n.d.	0.18	12.45	1119
n.d.	0.12	13.17	1163
Neryl acetate	0.60	13.22	1166
n.d.	0.32	13.45	1180
1,5-Heptadiene, 3,3,6-trimethyl	0.57	13.78	1200
Thymol acetate	1.11	13.91	1208
Piperitone	3.39	14.55	1247
Nerol	20.11	14.75	1259
p-menth-2-ene-1,8-diol	1.76	14.78	1261
Isoeugenol	0.49	15.06	1278
Diosphenol	2.02	15.43	1300
$\beta$ -terpinyl acetate	2.54	15.71	1317
Ocimenol	3.14	16.47	1364
2,8-dihydroxy-p-menth-3-en-5one	0.16	16.73	1379
n.d.	5.21	16.96	1393
2-pentadecanone	2.2	17.58	1431
p-menth-1-en-7,8-diol	1.14	18.04	1459
Linalool 3,7-oxide	0.14	18.55	1490
n.d.	0.56	20.24	1593
Hexadecanoic acid methyl ether	5.56	22.45	1727
Oleic acid	4.76	23.33	1781
Ethyl palmitate	0.41	24.58	1857
<b>Total identified</b>	<b>71.14</b>		
<b>Total detected</b>	<b>86.90</b>		
Dodecane			1200
Pentadecane			1500
Hexadecane			1600
Octadecane			1800
Eicosane			2000

Identification of constituents was based on mass spectral fragmentation using the mass spectra library of National Institute of Standards and Technology (NIST 3.0) and by Kovac's retention index. n.d. = no determinate.



acid (232 mg), 5-hidroxy-7,4' dimethoxy flavone (16 mg), and salvigenine (6 mg) were isolated. In addition, a mixture of the methyl esters of corosolic and maslinic acids (16 mg) were also obtained.

The methanol extract afforded acacetin (70 mg) and (2-acetyl)-7-O-gucosyl acacetin (97 mg). The identification of these compounds was achieved by means of their peracetate derivatives as well as the comparison of their physical and spectral data with those reported in literature (Itokawa et al., 1981).

#### 4. Discussion

The results of the qualitative and quantitative analyses of the essential oils clearly indicate that both taxa synthesized different compounds (Table 1). While *A. mexicana* subsp. *xolocotziana* produced large quantities of pulegone (80.07%), *A. mexicana* subsp. *mexicana* synthesized methyl chavicol (86.78%) almost exclusively. This chemical difference in their essential oils between the two taxa contributed to their remarkable difference in odor.

Literature review indicates that of the several *Agastache* species widely studied, *A. rugosa* and *A. foeniculum* generally produce large quantities of methyl chavicol in their essential oils, (Tirillini et al., 1997; Xuan-Dung et al., 1996; Weyersthal et al., 1992; Mazza and Kiehn, 1992; Wilson et al., 1992), while *A. nepetoides* produces  $\delta$ -cadinol as a major constituent (Charles et al., 1991) and *A. scrophulariifolia* yields isomenthone as a principal component (Lognay et al., 2002). On the other hand, an atypical population of *A. rugosa* showed almost the same chemical composition as *A. mexicana* subsp. *xolocotziana* (Fuentes-Granados et al., 1998). Therefore, the chemical composition of the essential oil of *A. mexicana* subsp. *xolocotziana* is remarkably different from this species and subsp. *mexicana*, as well as from the typical *A. rugosa*, *A. foeniculum* and *A. nepetoides*. Another remarkable difference in the chemical composition of these two taxa was found in their hexane extracts. The compounds detected by GC-MS techniques in the hexane extract of *A. mexicana* subsp. *mexicana* are shown in Table 2. According to these results, only 11 compounds were detected, methyl chavicol, butanoic acid-3-hexenyl ester, and palmitic acid were the most abundant.

On the other hand, the hexane extract of *A. mexicana* subsp. *xolocotziana* hexane extract showed the presence of 38 compounds from which nerol, pulegone, and piperitone were the most abundant (Table 3).

In contrast, the EtOAc and methanol extracts of both taxa were similar in terms of their chemical composition. Ursolic acid was the main constituent of the EtOAc extracts in both taxa, with a minor concentration of corosolic and maslinic acid in the extract of *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*. The flavones acacetin and (2-acetyl)-7-O-gucosyl acacetin were the main constituents in both methanol extracts. These results are in full agreement with previous studies of *Agastache* (Chang-Hung et al., 1979; Sanders et al., 1980; Itokawa et al., 1981; Barberán, 1986; Barberán and Gill, 1992).



According to these results, the chemical composition of essential oils and non-polar constituents in both taxa are different. These data support their recognition as distinct subspecies. On the other hand, the presence of ursolic acid, acacetin and its derivatives in the polar extract is a clear characteristic in species of *Agastache* (Chang-Hung et al., 1979; Sanders et al., 1980; Itokawa et al., 1981; Barberán, 1986; Barberan and Gill, 1992).

The dissimilarity in essential oil constituents between the spontaneous race (*A. mexicana* subsp. *mexicana*) and the cultivated race (*A. mexicana* subsp. *xolocotziana*) correlate with their morphological differences (with the latter taxon having fewer teeth on the leaf margins, with (vs magenta) flowers, fewer cymes per inflorescence, sterile fruits, and thicker rhizomes). This subspecific classification follows that recommended for cultivated plants (Harlan and de Wet, 1971). Because the samples reported here were obtained from comparable plant parts derived from two populations growing at the same site and harvested at the same time, the chemical differences reflect more their genetic bases than the influences of morphological, seasonal, and environment factors, which are known to cause variations in the composition and content of essential oils in *Agastache* (Fuentes-Granados et al., 1998). Essential oil chemotypes have also been recognized in *A. foeniculum* (Pursh) Kuntze and *A. rugosa* (Fisher & Meyer) Kuntze (the latter being recognized taxonomically as *A. rugosa* var. *methyleugenolifera*) where the typical population contains high amounts of methyl chavicol while the atypical population is dominated, respectively, by myrcene and methyleugenol (Wilson et al., 1992; Fujita and Fujita, 1970, 1973, in Fuentes-Granados et al., 1998).

### Acknowledgements

We are indebted to Hector Ríos, Carmen Márquez Alonso, María de las Nieves Zavala Javier Pérez, and Gabriela Salcedo for technical assistance. Partial financial support from CONACYT (34992-N) is acknowledged.

### References

- Argueta, A., Cano, L., Rodarte, M., 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. . México, Instituto Nacional Indigenista Press, México, D.F. (pp. 1193).
- Barberan, F.A.T., 1986. The flavonoid compounds from Labiate. *Fitoterapia* 57, 67–95.
- Barberan, F.A.T., Gil, M.L., 1992. Chemistry and Natural Distribution of Flavonoids in the Labiate. In: Harley, R.M., Reynolds, T. (Eds.), *Advance in Labiatae Science*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 299–305.
- Bye, R., Linares, E., Ramamoorthy, T.P., García, F., Collera, O., Palomino, G., Corona, V., 1987. *Agastache mexicana* Subs. *xolocotziana* (Lamiaceae). A new taxon from mexican medicinal plants. *Phytologia* 62, 156–163.
- Chang-Hung, C., Ulubelen, A., Mabry, T.J., 1979. Chemistry of *Agastache*, Part I, Flavonoids of *Agastache pallidiflora*. *Rev. Latinoamer. Quím.* 10, 136–138.
- Charles, D.J., Simon, J.E., Widrechner, M.P., 1991. Characterization of Essential Oil of *Agastache* Species. *J. of Agric. Food Chem* 39 (11), 1946–1949.

- Davies, N.M., 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20 m phases. *J. Chromatogr.* 503, 1–24.
- Exner, J., Ulubelen, A., Mabry, T.J., 1981. Chemistry of Agastache, Part II. Flavonoids of *Agastache aurantiaca*. *Rev. Latinoamer. Quim.* 12, 37–38.
- Fuentes-Granados, R.G., Widrechner, M.P., Wilson, L.A., 1998. An Overview of *Agastache*. *J. Herbs, Spices Med. Plants* 61 (1), 69–97.
- Fuentes-Granados, R.G., Widrechner, M.P., Wilson, L.A., 2000. Inheritance Studies of Aromatic Compounds in *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze. *J. Essent. Oil Res.* 12, 581–594.
- Fujita, S., Fujita, Y., 1970. Miscellaneous contributions to the essential oils of the plants from various territories: XXVI. Essential oil of *Agastache formosanum* Hay. (actually *A. rugosa*). *Yakugaku Zasshi* 90, 1514–1516.
- Fujita, S., Fujita, Y., 1973. Miscellaneous contributions to the essential oils of the plants from various territories: XXXII. Essential oil of *Agastache rugosa* O. Kuntze. *Yakugaku Zasshi* 93, 1681–1697.
- Harlan, J.R., de Wet, J.M., 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon* 20, 509–517.
- Hegnauer, R., 1973. *Chemotaxonomie der pflanzen eine ubersicht uber die uber die systematische bedeutung der Pflanzenstoffe* vol. 4. Birkhauser Verlag, Germany.
- Itokawa, H., Suto, K., Takeya, K., 1981. Structures of Isoagastochoside and Agastachin, New Glucosylflavones Isolated from *Agastache rugosa*. *Chem. Pharm. Bull.* 29, 1777–1779.
- Kamaya, R., Masuda, K., Suzuki, K., Ageta, H., Hsü, H., 1996. Fern Constituents: Sesterpenoids Isolated from Fronds of *Aleuritopteris mexicana*. *Chem. Pharm. Bull.* 44, 690–694.
- Lewis, K.G., Tucker, D.J., 1983. The Separation of Substituted Olean-12-en-28-oic Acids from the Corresponding Urs-12-en-28-oic Acid Isomers. *Aust. J. Chem.* 36, 2297–2305.
- Linares, E., Flores, B., Bye, R., 1988. *Selección de plantas medicinales de México*. Limusa Press, México.
- Linares, E., Flores, B., Bye, R., 1995. *Plantas medicinales de México: Usos y remedios tradicionales*, 2nd ed. Centro de Tecnología Electrónica e Informática (CETEI) y el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IB-UNAM), México.
- Lognay, G.C., Verscheure, M., Steyel, B., Marlier, M., 2002. Volatile constituents of *Agastache scrophuriaeifolia*. *J. Essent. Oil Res.* 14, 42–43.
- Manjarrez, A., Mendoza, A., 1966. The volatile oils of *Agastache mexicana* (Benth) Epling and *Cunila lythrifolia* Benth. *Perfum. Essent. Oil. Rec.* 57, 561–562.
- Masada, Y., 1976. *Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry*. John Wiley & Sons, Inc, USA.
- Mazza, G., Kiehn, F.A., 1992. Essential Oil of *Agastache foeniculum*, a Potential Source of Methyl Chavicol. *J. Essent. Oil Res.* 4, 295–299.
- Sanders, R.A., Ulubelen, A., Mabry, T.J., 1980. Chemistry of Agastache, Part III: Flavonoids of *Agastache micrantha*. *Rev. Latinoamer. Quim.* 11, 139.
- Sanders, R.W., 1987. Taxonomy of *Agastache* section *Brittonastrum* (Lamiaceae-Nepeteae). *Syst. Bot. Monogr.* 15, 1–92.
- The Aldrich library of <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H Ft NMR, 1993. *Spectra Edition* vol 1, P55,570–8. Pourchel, J., Behnke J. Aldrich, USA.
- The Aldrich library of NMR Spectral Edition II, 1983. Vol 1 A2,920–8. Pourchet C. J. Aldrich, USA.
- Tirillini, B.B., Menghini, A.A., Pellegrino, R.R., 1997. Constituents of the Leaf Secretory Hairs of *Agastache foeniculum* Kuntze. *J. Essent. Oil Res.* 9, 19–21.
- Van den Dool, H., Kratz, P.D., 1963. Generation of retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* 11, 463–471.
- Vigar, U.A., Rahman, A., 1994. *Handbook of Natural Products Data. Pentacyclic Triterpenoid* vol. 2. Elsevier, The Netherlands, Amsterdam, (770–773).
- Weyersthal, P., Marshall, H., Manteuffel, E., Huneck, S., 1992. Volatile Constituents of *Agastache rugosa*. *J. Essent. Oil Res.* 4, 585–587.
- Wilson, L.A., Senechal, N.P., Widrechner, M.P., 1992. Headspace analysis of the volatile oils of *Agastache*. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1362–1366.



694 R. Estrada-Reyes et al. / *Biochemical Systematics and Ecology* 32 (2004) 685–694

Xuan-Dung, N., Dam-Cu, L., Huy Thai, L., Dinh, Moi, Van Hac, L., Leclercq, P.A., 1996. Constituents of the Leaf and Flower oils of *Agastache rugosa* from Vietnam. *J. Essent. Oil Res.* 8, 135–138.

Youssef, D.A., Frahm, A.W., 1995. Constituents of the Egyptian *Centaurea scopararia*: III. Phenolic constituents of the aerial part. *Planta Med* 61, 570–573.



## Depressant effects of *Clinopodium mexicanum* Benth. Govaerts (Lamiaceae) on the central nervous system

R. Estrada-Reyes <sup>a,b</sup>, M. Martínez-Vázquez <sup>b,\*</sup>, A. Gallegos-Solís <sup>a</sup>, G. Heinze <sup>c</sup>, J. Moreno <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Fitofarmacología, Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Calzada México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Delegación Tlalpán, México City 14370, México

<sup>b</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyocacán, México D.F. 04510, México

<sup>c</sup> Dirección de Servicios Clínicos, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Calzada México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Delegación Tlalpán, México City 14370, México

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 September 2009

Received in revised form 30 January 2010

Accepted 10 March 2010

Available online 31 March 2010

#### Keywords:

Depressant

Central nervous system

Sedative-hypnotic

*Clinopodium mexicanum*

*Satureja mexicana*

Toronjil

### ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** The decoction of leaves of *Clinopodium mexicanum* Benth. Govaerts (Lamiaceae), commonly known as "Toronjil de Monte", is used in the Mexican traditional medicine to induce sleep, as well as sedative and analgesic remedy.

**Aim of the study:** To evaluate the putative depressant effects of an aqueous extract of the medicinal plant *Clinopodium mexicanum* on the central nervous system (CNS).

**Materials and methods:** The effects of the extract (AECM) on mice were tested in several animal paradigms, including sodium pentobarbital-induced sleep, open field tests, and hole-board tests. The effects of AECM on pentylenetetrazole- and picrotoxin-induced convulsions in mice and on the antithermonociceptive response in the hot-plate paradigm were also tested. Additionally, the active extract (AECM) was analyzed with HPLC–ESI–MS techniques.

**Results:** Mice acutely treated with AECM at 100, 200, 500 and 1000 mg/kg doses prolonged the sleeping time induced by sodium pentobarbital (42 mg/kg). This extract, at 100 and 200 mg/kg doses, showed a sedative effect in the hole-board paradigm and decreased spontaneous activity in mice. AECM at 10, 100 and 200 mg/kg prolonged the onset of seizures induced by pentylenetetrazole (90 mg/kg) and antagonized tonic convulsions induced by picrotoxin (10 mg/kg). Additionally, AECM inhibited the response to a thermociceptive stimulus. The intraperitoneal AECM treatment produced mortality with an LD<sub>50</sub> = 2154 mg/kg. Chemical analysis showed that the flavanone glycosides neoponcinin, poncinin, and isonaringenin are the main compounds of the active extract.

**Conclusions:** This study demonstrates that an acutely administered single dose of an aqueous extract of *Clinopodium mexicanum* can exert depressant effects on the CNS. These findings are in agreement with the traditional use of *Clinopodium mexicanum* to induce sleep as well as sedative and analgesic remedy. The chemical analysis of AECM revealed the presence of the flavanone glycosides neoponcinin, poncinin, and isonaringenin.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Clinopodium* (Lamiaceae) is a cosmopolitan genus whose distribution covers southern and southeastern Europe, Anatolia, northern Iran, Russia, Asia, Ethiopia, the United States of America, and Mexico. This wide distribution enables the medical use of several species. For example, in Pakistan, *Clinopodium umbrosum* and *Clinopodium vulgare* are both used to treat wounds, bleeding and cardiac problems (Khan and Khatoun, 2008). In the USA, a

decoction of *Clinopodium douglasii* has been used by the Costanoan Indians as an anthelmintic remedy (Bocek, 1984). In Portugal, the leaves of *Clinopodium ascendens* are used as a mouth freshener and to alleviate headache and toothache (Castilho et al., 2006).

In Mexico, the genus *Clinopodium* is represented by 13 aromatic species, some of which are used as medicinal herbs. *Clinopodium mexicanum* Benth. Govaerts (Lamiaceae) (Syn. *Gardoquia mexicana* Benth, *Satureja mexicana* (Benth.) Brinq.) is a perennial herb endemic to Hidalgo, Guerrero, Oaxaca, and Veracruz States. This species possesses small red-colored flowers, often attains a height of 30–80 cm, and is more commonly known by its vernacular name "Toronjil de Menta" (mint's hyssop). Local people use the whole plant to relieve toothache and "nervousness" (Harley and Granda, 2000). In Mexico City, *Clinopodium mexicanum* is also known as

\* Corresponding author.

E-mail addresses: oscar.martinezvazquez@gmail.com, marvaz@servidor.unam.mx (M. Martínez-Vázquez).

"Toronjil de Monte" (hill's hyssop). Due to its putative tranquilizing properties, it is widely commercialized in the Sonora market, which is the largest medicinal plant market in the country (Aguilar et al., 1994). Thus, aqueous preparations of *Clinopodium mexicanum* have been used as remedies for nervous diseases, to induce sleep, and as a sedative and analgesic agent (García Rivas, 2000). Previous phytochemical studies on species of the *Clinopodium* genus have revealed the presence of free flavonoids and flavonoid glycosides (Opalchenova and Obreshkova, 1999). Flavonoids are phenolic pigments of plants that possess various biological activities, including anti-inflammatory (Martínez-Vázquez et al., 1996), cystostatic (Hirano et al., 1994), cytotoxic (Woerdenbag et al., 1994), *in vivo* anticancer (Menon et al., 1995) and antiviral (Kaul et al., 1985) properties. Furthermore, it is known that some flavonoids, as well as their glycosides, exert anxiolytic, sedative, pro-convulsant, and anticonvulsant effects on the CNS (Marder et al., 2003; Ibrahim et al., 2008; Kavvadias et al., 2004; Fernández et al., 2004, 2006).

Despite its intensive use in traditional Mexican medicine, no data on the chemical composition or biological activity of the aerial parts of *Clinopodium mexicanum* are available. This prompted us to study the putative sedative, anticonvulsant, and antinociceptive effects of an aqueous extract of this species in mice, as well as to evaluate its general toxic effects. In addition, to identify the main compounds of the *Clinopodium mexicanum* active aqueous extract, an HPLC-ESI-MS analysis was carried out.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

Leaves of *Clinopodium mexicanum* Benth. Govaerts (Lamiaceae) were collected in Chilapa, Guerrero State, Mexico. The species was authenticated by botanist M. R. García Peña, and a voucher specimen was deposited in the Herbario del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU No. 946030).

### 2.2. Preparation of *Clinopodium mexicanum* aqueous extract (AECM)

Air-dried and finely ground leaves (10 g) of *Clinopodium mexicanum* were extracted by boiling in distilled water (90 mL) for 10 min. The resulting solution was lyophilized in a Telstar freeze dryer at  $-50^{\circ}\text{C}$  and 0.01 mbar, resulting in a corresponding extract (AECM) yield of 1.63%. The extract was stored at  $4^{\circ}\text{C}$  until the pharmacological assays were conducted. The pharmacological assays were performed with aqueous solutions of the AECM. Doses are expressed as milligrams of AECM per kilogram of body weight per mouse.

### 2.3. Preparation of organic extracts

Dried ground leaves of *Clinopodium mexicanum* (100 g) were extracted successively with hexane, ethyl acetate (EtOAc), and methanol (MeOH). Evaporation of the solvents under a vacuum yielded the respective extracts. Each extract was analyzed by column chromatography (CC).

The chromatography process was performed using an open column packed with 60 GF<sub>254</sub> Merck silica gel at a proportion of 1:15 with respect to the extract. In each case, elution began with hexane followed by mixtures of hexane and EtOAc, EtOAc, mixtures of EtOAc and MeOH with increasing polarity, and MeOH.

#### 2.3.1. Isolation of hesperidin, neoponcirin, 5-desmethoxynobiletin, naringenin, 8-hydroxy-salvigenin, 4'-O-methylnaringenin, gardenin B

The hexane extract (3.65 g, 3.65%, w/w, with respect to dried plant material) was separated by CC. Fractions of 100 mL

were collected and those with similar TLC profiles were combined.  $\beta$ -Sitosterol was isolated from the fractions eluted with hexane-EtOAc (9:1) (10 mg, 0.01%). Ursolic acid (25 mg, 0.025%) was isolated from the fractions eluted with hexane-EtOAc (8:2), and 8-hydroxysalvigenin (syn. pedunculin) was isolated from the fractions eluted with hexane-EtOAc (6:4) (54 mg, 0.054%).

The EtOAc extract (8.5 g, 8.5%, w/w) was also separated by CC. The fractions eluted with hexane-EtOAc (6:4) were combined and subjected to flash chromatography, yielding 8-hydroxysalvigenin (15 mg, 0.015%). A second pool from the fractions eluted with hexane-EtOAc (6:4) was purified by flash chromatography, yielding 5-desmethoxynobiletin (98 mg, 0.098%), 4'-O-methylnaringenin (7 mg, 0.003%), and gardenin B (25 mg, 0.025%). The fractions eluted with hexane-EtOAc (2:8) were combined, separated by preparative chromatography and eluted with hexane:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (2:6:2), yielding 116 mg (0.01%) of neoponcirin (syn. didymin and isosakuranetin 7-O-rutinoside). The fractions eluted with EtOAc:MeOH (8:2) were also combined and separated by preparative layer chromatography using an EtOAc:MeOH (8:2) mixture with an elution system, yielding hesperidin (110 mg, 0.01%) and daucosterol (50 mg, 0.004%).

From the MeOH crude extract, hesperidin was obtained by precipitation (200 mg, 0.018%), and the remaining extract was separated by CC. Naringenin (20 mg, 0.0018%) was obtained from the pool of fractions eluted with hexane:EtOAc (8:2), and neoponcirin was obtained from the fractions eluted with EtOAc:MeOH (1:1).

The identity and purity of the isolated compounds was confirmed by comparison of their physical and spectral properties (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, and MS) with those reported in the literature (Lewinsohn et al., 1986; Grayer et al., 2001; Venturella et al., 1961; Da-yong et al., 2006; Chul et al., 2007; Avula et al., 2005).

### 2.4. Chemical characterization of AECM

In order to identify the main constituents of the active aqueous extract, an analytical method was developed using high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). The analysis was carried out with an analytical HPLC (Waters model 600) equipped with a UV-vis detector coupled to an ion trap mass spectrometer (Bruker Esquire model 6000). Chromatographic conditions were as follows: a Synergi Polar-RP 150 mm  $\times$  2.0 mm column with ID = 4  $\mu\text{m}$  was used, the mobile phase was an acetonitrile-water solvent system (10:90, v/v, at 0 min to 100, v/v, at 30 min), the flow-rate was 0.2 mL/min, and the injection volume was 5  $\mu\text{L}$  of AECM concentrated solution in water. The temperature was established and set at  $25^{\circ}\text{C}$ , and the detection wavelength was 254 nm. A positive ion mass spectrum of the column eluant was recorded in the range of  $m/z$  100–1000 amu with a scan cycle time of 2 s. ESI-IT source conditions were adjusted as follows: drying N<sub>2</sub> at 10 L/min, capillary temperature =  $350^{\circ}\text{C}$ , spray voltage = 40.0 V, auxiliary gas pressure = 30 psi (Wu et al., 2004).

The compounds of the active extract were identified and quantified by comparison of their retention time (RT), HPLC peak, and  $M^+$  to 8-hydroxy-salvigenin, gardenin B, 5-desmethoxynobiletin, 4'-O-methylnaringenin, naringenin, hesperidin, and neoponcirin, which were all previously isolated from the organic extracts of *Clinopodium mexicanum* and used as standards. The HPLC peak areas were not corrected for response factors and are reported as the relative percentage of area.

### 2.5. Animals

Adult male Swiss Webster mice (20–30 g) were used. All animals were housed eight per cage in a temperature-controlled ( $20$ – $21^{\circ}\text{C}$ ) room under inverted light:dark conditions (12:12 h, lights on at 22:00 h). All behavioral evaluations were performed between 10:00

and 14:00h. Animals had *ad libitum* access to Purina rodent chow and water. Animals were handled in agreement with the general principles of laboratory animal care (NIH publication # 85-23, revised in 1985) and the 'Norma Oficial Mexicana' (NOM-062-ZOO-1999). All the experimental sessions were videotaped and analyzed by an observer unaware of the treatment conditions.

## 2.6. Drugs

All drugs in this study were intraperitoneally (i.p.) injected in a total volume of 10.0mL/kg body weight. The fresh AECM and sodium pentobarbital (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) were dissolved in isotonic solution (0.9% NaCl). Diazepam (Hoffmann-La Roche, Mexico City, Mexico) and ketorolac (Aldrich-Sigma, Mexico City, Mexico) were dissolved in 1.0% propylene glycol. Control animals received the same volume of the vehicle (isotonic solution, 0.9% NaCl).

## 2.7. Pharmacological evaluations

For habituation, animals received a daily i.p. injection of saline solution (0.1 mL/10g) for 5 days before treatments were initiated. Diazepam (DZ) was used as a reference drug in both the sedative and anticonvulsant tests, and ketorolac was used as a reference in the antinociceptive test. Doses and latencies for AECM were obtained from previous pilot studies.

### 2.7.1. Test of sodium pentobarbital-induced sleeping time

The sedative and hypnotic effects of AECM in combination with sodium pentobarbital (SP) were evaluated. For this purpose, a total of 64 mice were divided into eight groups ( $n=8$ ). Five groups received AECM (10, 100, 200, 500, and 1000mg/kg i.p., respectively) 60min before the administration of SP (42mg/kg, i.p.). Two other groups received DZ (0.5 and 1.0mg/kg, i.p., respectively) 30min before the administration of SP (42mg/kg); these two groups served as positive controls. An independent group was injected with the vehicle 60min before the i.p. administration of the 42mg/kg dose of SP, and this group served as a negative control.

Each mouse was placed on a warm table and was carefully observed for the onset of uncoordinated movements corresponding to the sedative phase of the test. Loss of the righting reflex related to the hypnosis phase and the duration of sleep were also observed. The time elapsed between the loss and recovery of the righting reflex was considered as the sleeping time (Tingli et al., 2007).

### 2.7.2. Hole-board test

The hole-board set-up apparatus is a wooden box of 60 cm  $\times$  60 cm  $\times$  30 cm with four equidistant holes (2 cm diameter) on the floor. AECM was administered in varying doses (1.0, 10, 100, and 200mg/kg, i.p.) to groups of eight mice each. After 60min, each mouse was placed in the center of the hole-board and the number of head-dips into the holes, the time spent head dipping, and the number of rears were recorded over a 5 min period.

One group of eight animals received DZ (2.0mg/kg) 30min before the test was conducted and this group served as a reference standard. One group receiving only the vehicle served as a negative control. After each trial, the floor of the apparatus was carefully cleaned to remove traces of previous paths. A decrease in the number of head dips, the head-dipping time, and the number of rears compared to the controls were considered to indicate a sedative effect (Viola et al., 1995).

### 2.7.3. Open field test

Spontaneous locomotor activity was measured immediately after completing the hole-board test; it was tested using an open field apparatus made of an opaque-Flexiglas box

(40 cm  $\times$  30 cm  $\times$  20 cm) with the floor divided into 12 equal squares. Each animal was gently placed in a corner of the apparatus and its behavior was videotaped during a 5 min session. An observer, blind to the pharmacological treatment, registered the number of times the animal entered each square (counts per 5 min) (López-Rubalcava et al., 2006).

### 2.7.4. Effect on pentylenetetrazole-induced convulsions in mice

Mice received daily administrations of saline (10mL/kg i.p.) for five days to allow them to adjust to manipulation. Twenty-four hours after the last saline injection, animals received AECM (10, 100, or 200mg/kg, or saline,  $n=8$ ), and pentylenetetrazole (PTZ) (90mg/kg, i.p.) was administered 1 h thereafter. The amount of time that elapsed between administration of the pro-convulsive and the first myoclonus and tonic extension were visually evaluated over a period of 40min. The percentage of animals that died during this interval was also recorded.

Mice that did not convulse within 40min after PTZ administration were considered protected. (Olufunmilayo et al., 2007). DZ (0.5 and 1.0 mg/kg) was used as a reference standard.

### 2.7.5. Picrotoxin-induced convulsions in mice

Mice received daily administration of saline (10mL/kg, i.p.) for 5 days before the treatments were initiated. On the sixth day, AECM was administered at a dose of 1.0, 10, 100, or 200mg/kg to groups of eight mice, and picrotoxin (10mg/kg) was administered 60min afterwards. The presence or absence of clonic convulsions, as well as the latency to clonus and tonic seizures, was observed for 40min following the administration of picrotoxin. The percentage of mice found to be protected from the effects of picrotoxin was recorded.

### 2.7.6. Hot-plate test

AECM was administered at doses of 1.0, 5.0, 10 or 100mg/kg (i.p.) to groups of eight mice 60min before the beginning of the test. Three groups of animals received ketorolac at doses of 1.0, 20.0, and 30.0 mg/kg 30min before beginning the test. These groups served as positive controls. One group received the vehicle and served as a negative control. Each mouse was introduced into a glass cylinder (20 cm in diameter and 25 cm in height) placed at the center of a metal plate (Uge baseline, model DS 37) adjusted to  $53 \pm 0.5$  °C. Within several seconds, the animals displayed specific responses evoked by the thermal stimulation, including the flexor antalgic reflex and paw-licking behaviors. If the mouse did not respond within 50s, the test was terminated, and the mouse was immediately removed from the hot plate to avoid tissue damage and returned to its home cage. Animals were tested one at a time and were not habituated to the apparatus prior to testing. Each animal was tested only once (Floyd, 1990; Cruz et al., 2001).

## 2.8. Acute toxicity study ( $LD_{50}$ )

The  $LD_{50}$  of the extract was determined by administration through the i.p. route according to Lorke's method (Lorke, 1983). Briefly, in the first stage, the aqueous extract was intraperitoneally administered at doses of 10, 100, and 1000 mg/kg to three groups of three mice each. The animals were observed for 1 h for signs and symptoms of toxicity. Later observations were made every 24 h for 7 days. In the second phase, doses of 1000, 1600, 2900, and 5000mg/kg were administered to groups consisting of one, two, three, and five animals respectively. These mice were carefully observed until their total recovery or death. The surviving animals were observed for 14 days in order to record mortality. The surviving animals were observed for 14 days in order to record mortality.

**Table 1**  
Sedative and hypnotic actions of AECM and diazepam (DZ) in combination with pentobarbital (SP).

Treatment (mg/kg)	SeL (min)	SL (min)	ST (min)
SP42 Vehicle	1.45±0.10	3.85±0.28	13.47±2.22
SP42 AECM 10	1.31±0.22	3.29±0.34	23.31±1.97
SP 42 AECM 100	1.27±0.16	3.00±0.33*	25.02±2.37*†
SP42 AECM 200	1.65±0.11	1.94±0.21***	55.03±3.73***†
SP42 AECM 500	1.13±0.10*	1.80±0.10***	74.05±5.57***†
SP42 AECM 1000	0.95±0.11*	1.88±0.22***	103.05±8.22***†
SP42 DZ 0.5	1.53±0.13	5.16±0.31	14.68±1.77
SP42 DZ 1.0	1.17±0.12	3.31±0.40*	30.75±1.98***
	<i>H</i> =28.352, <i>fd</i> =10 ( <i>p</i> =0.0002)	<i>H</i> =49.068, <i>fd</i> =9 ( <i>p</i> <0.0001)	<i>H</i> =73.176, <i>fd</i> =9 ( <i>p</i> <0.0001)

Effects of AECM on sedative latency (SeL), sleeping latency (SL), and sleeping time (ST). All results are expressed as means±SEM (*n*=8–10 animals in each group). Sodium pentobarbital at 42 mg/kg; SP42.

Comparisons were made by using Kruskal–Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks followed by the Mann–Whitney *U*-test: \**p*<0.05 and \*\*\**p*=0.001 compared with the control group.

Differences between treated groups in the sleeping time data were made using Dunn's test: †*p*<0.05.

**Table 2**  
Effect of AECM on the performance of mice in the hole-board test.

Treatment (mg/kg)	HDT (min) (mean±SEM)	RN (min) (mean±SEM)	HDN (min) (mean±SEM)
Control	0.44±0.12	21.63±2.03	28.3±5.44
10.0	0.51±0.08	16.63±2.71	34.0±12.87
100.0	0.40±0.13*	11.75±1.90***	21.9±1.96*
200.0	0.39±0.06***	1.75±0.81***	17.5±2.82**
DZ 2.0	0.31±0.05***	3.38±0.42***	22.6±1.91***
	<i>H</i> =27.2, <i>fd</i> =7 ( <i>p</i> =0.0003)	<i>H</i> =39.1, <i>fd</i> =7 ( <i>p</i> =0.0001)	<i>H</i> =25.1, <i>fd</i> =17 ( <i>p</i> =0.02)

Legend: Effect of AECM on sedative behavior [head-dipping time (HDT), rearing number (RN), and head-dipping number (HDN)]. All results are expressed as means±SEM of 8–10 animals per group. Comparisons were made by using Kruskal–Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks followed by the Mann–Whitney *U*-test: \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 and \*\*\**p*=0.001 compared with the control group.

### 2.9. Statistical analysis

Since some data did not meet normality or variance equality criteria, a non-parametric analysis was employed. Differences between treated and control groups in all tests were analyzed using a Kruskal–Wallis analysis of variance on ranks (\**p*<0.05, \*\**p*<0.01, and \*\*\**p*<0.001), followed by the Mann–Whitney Rank Sum test. Differences between treated groups were analyzed using Dunn's test. The proportion of animals that died was analyzed using the Fisher test. All statistical analyses were carried out using the Sigma Stat Program (version 3.1, Jandel Scientific).

### 3. Results

The use of pentobarbital-induced sleep in mice is a classic pharmacological method for the screening of sedative-hypnotic drugs. The sedative and hypnotic actions of AECM administered to mice in combination with sodium pentobarbital (SP) are shown in Table 1. AECM at doses of 10, 100, 200, 500, and 1000 mg/kg, in combination with SP, exhibited significant synergistic sedative and hypnotic effects (*H*=28.352, *fd*=10, *p*<0.001); moreover, sleep latency was significantly shortened (*H*=49.06, *fd*=9, *p*<0.001). Although these effects did not show a dose-dependent response, the duration of the sleeping time produced by SP was significantly prolonged in a dose-dependent manner (*H*=73.17, *fd*=9, *p*<0.001).

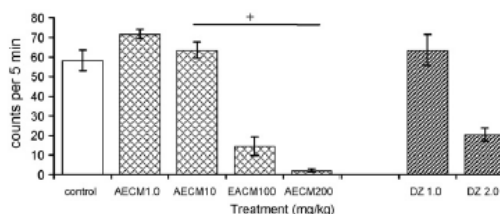
The sedative effect of AECM was confirmed in the hole-board test. However, at a dose of 10 mg/kg, AECM did not alter the exploratory parameters in the hole-board test or the SP-induced sleep test. Nevertheless, AECM at doses of 100 and 200 mg/kg showed sedative effects in both tests.

Table 2 shows the effects of both DZ (2.0 mg/kg) and AECM (100 and 200 mg/kg) on the performance of mice in the hole-board test. These treatments significantly decreased the head-dipping number (*H*=25.1, *fd*=17, *p*<0.05), the head-dipping time (*H*=27.2,

*fd*=7, *p*<0.001), and the number of rears (*H*=39.1, *fd*=7, *p*≤0.001) relative to the group control. Furthermore, AECM significantly decreased the spontaneous ambulatory activity of the mice in the open field test (*H*=28.4, *fd*=7, *p*<0.001) (Fig. 1). All of these results confirm the sedative effect of AECM.

In the PTZ model, DZ delayed the latency time of myoclonus, prevented tonic seizures, and decreased the incidence of death in comparison to the control group. AECM did not inhibit the appearance of myoclonic and tonic seizures. However, it significantly delayed the onset of pentylenetetrazole-induced convulsions at doses ranging from 10 to 200 mg/kg (*p*<0.001). The time to death and the percentage of dead animals were also reduced by AECM administration. However, this effect was not dose-dependent and it only reduced the number of deaths preceded by tonic seizures by 50% (Table 3).

Furthermore, AECM administration significantly delayed the appearance of both clonic and tonic seizures (*H*=27.16, *fd*=5, *p*≤0.001, and *H*=31.26, *fd*=5, *p*≤0.001, respectively), and it reduced the mortality induced by picrotoxin. However, compared to controls, 200 mg/kg AECM significantly delayed the onset of seizures from 6.3±0.4 min to 15.95±1.4 min, and it delayed

**Fig. 1.** Effect of AECM on the ambulatory behavior of mice in the Open Field Test.

**Table 3**  
Effect of AECM and diazepam (DZ = 1.0 mg/kg) on pentylenetetrazole-induced seizures in mice.

Treatment (mg/kg)	Seizure onset $\pm$ SEM (min)		Percentage of mortality
	Myoclonus	Tonic	
Control	0.68 $\pm$ 0.04	45 $\pm$ 1.29	100
DZ 1.0	2.20 $\pm$ 0.67***	NC	0.0
AECM 10	0.80 $\pm$ 0.03*	14.23 $\pm$ 3.26***	75 <sup>a</sup>
AECM 100	0.75 $\pm$ 0.10*	13.57 $\pm$ 1.76***	50 <sup>b</sup>
AECM 200	1.27 $\pm$ 0.25***	12.88 $\pm$ 3.02***	50 <sup>b</sup>
	$H = 28.13$ , $fd = 5$ ( $p \leq 0.001$ )		$H = 88.3$ , $fd = 5$ ( $p \leq 0.001$ )

Effect of AECM on pentylenetetrazole-induced seizure (90 mg/kg). Data represent means  $\pm$  SEM of 8–10 animals. NC: no convulsion. Comparisons were made by using Kruskal–Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks followed by the Mann–Whitney U-test: \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p = 0.001$  compared with the control group. Effect of AECM on mortality. Fisher test: <sup>a</sup> $p \leq 0.05$ , <sup>b</sup> $p \leq 0.01$  vs. the vehicle-treated group.

**Table 4**  
Effect of AECM on picrotoxin-induced seizures in mice.

Treatment (mg/kg)	Seizure onset $\pm$ SEM (min)		% Mortality
	Clonus	Tonic	
Control	6.3 $\pm$ 0.46	8.60 $\pm$ 0.68	100
DZ 1.0	6.80 $\pm$ 0.57	17.24 $\pm$ 1.60	50 <sup>a</sup>
AECM 10	9.81 $\pm$ 0.84*	9.81 $\pm$ 0.84	50 <sup>a</sup>
AECM 10	6.77 $\pm$ 0.43	18.86 $\pm$ 2.90***	62.5
AECM 100	7.89 $\pm$ 0.43*	22.75 $\pm$ 3.30***	37.5 <sup>b</sup>
AECM 200	15.95 $\pm$ 1.47***	25.40 $\pm$ 1.70**	0 <sup>c</sup>
	$H = 27.16$ , $fd = 5$ ( $p \leq 0.001$ )		$H = 31.26$ , $fd = 5$ ( $p \leq 0.001$ )

Effect of AECM on picrotoxin-induced seizures (10 mg/kg). Data represent means  $\pm$  SEM of 8–10 animals. NC: no convulsion. Comparisons were made by using Kruskal–Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks followed by the Mann–Whitney U-test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p = 0.001$  compared with the control group. Effect of AECM on Fisher test: <sup>a</sup> $p \leq 0.05$ , <sup>b</sup> $p \leq 0.01$  vs. the vehicle-treated group. <sup>c</sup>Results of Fisher test:  $p \leq 0.05$  vs. the control group. <sup>d</sup>Results of Fisher test:  $p \leq 0.001$  vs. the control group. <sup>e</sup>Results of Fisher test:  $p \leq 0.0001$  vs. the control group.

the latency time of tonic convulsions from  $8.60 \pm 0.68$  min to  $25.40 \pm 1.70$  min. This dose also prevented the deaths produced by picrotoxin (Table 4).

In the hot-plate test, ketorolac administration was effective at prolonging the reflex latency and the paw-licking response with respect to the control group, as shown in Fig. 2. Similarly the i.p. administration of AECM at doses of 1, 5, 10 and 100 mg/kg produced an increase in the reflex latency ( $H = 27.49$ ,  $fd = 5$ ,  $p < 0.001$ ) and an inhibition of the paw-licking response ( $H = 37.81$ ,  $fd = 5$ ,  $p < 0.001$ ) with respect to the control. These results show that AECM exerts an antinociceptive effect against thermal stimulus.

However, as pointed out above, at a dose of 100 mg/kg, AECM also presented a sedative effect, which could interfere with the

antinociceptive effect. Future studies should be undertaken to clarify this matter.

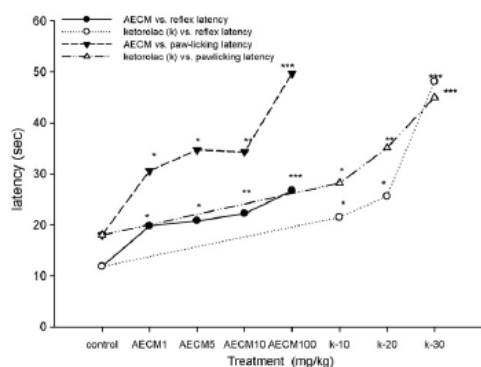
On the other hand, AECM was slightly toxic ( $DL_{50} = 2154$  mg/kg) according to Lorke's classification when it was intraperitoneally administered. At doses over 1600 mg/kg, some adverse effects, such as diarrhea and positive piloerection, were immediately seen after administration. Nevertheless, these effects disappeared after 1 h. At 2900 mg/kg, AECM produced toxic manifestations that persisted for 36 h until death.

The phytochemical study of organic extracts of this species led to the isolation and identification of two flavanone glycosides (neoponcirin and hesperidin), as well as three flavones (8-hydroxysalvigenin, gardenin B, and 5-desmethoxynobiletin) and two flavanones (naringenin and 4'-O-methylnaringenin). Additionally,  $\beta$ -sitosterol, ursolic acid, and daucosterol were also isolated. These compounds were identified by their physical and spectroscopic properties, and by comparison with published data. They were used as standards for the chemical analysis of AECM aqueous extract.

Active AECM was analyzed by HPLC–ESI–MS. The chromatogram and the full-scan mass spectrum are shown in Fig. 3. These results showed that neoponcirin (9.18% of relative area), poncirin (16.19% of relative area), and isonaringenin (16.10% of relative area) were the main components of AECM. 8-Hydroxysalvigenin (0.36%), naringenin (1.99%), 4'-O-methylnaringenin (0.20%), and gardenin B (0.95%) were detected also. Finally, 5-desmethoxynobiletin and hesperidin, which were isolated from organic extracts, were not detected in the active extract, Fig. 4.

#### 4. Discussion

Despite its intensive use in traditional Mexican medicine as a tranquilizer, *Klinopodium mexicanum* has not yet been evaluated



**Fig. 2.** Effects of AECM and ketorolac (k) on paw-licking latency (sec) and reflex latency (sec).



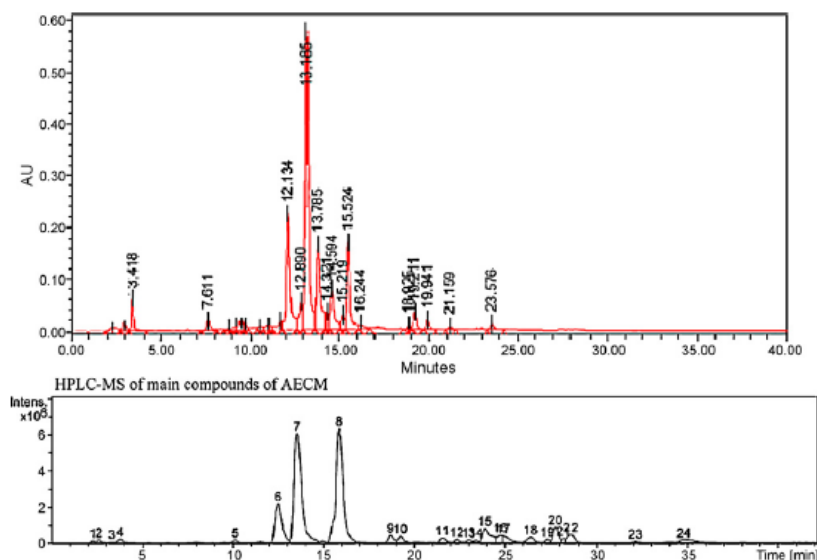


Fig. 3. HPLC profile of AECM.

for its activity toward the CNS. The present study investigated the putative CNS effects of an aqueous extract of the leaves of *Clinopodium mexicanum* (AECM) in mice. The results showed that AECM exerts depressant effects on the CNS. Although AECM *per se* did not induce sleep, the animals treated with the extract were found to be awkward, calm and relaxed. Nevertheless, acute administration of AECM at single doses of 100, 200, 500 and 1000 mg/kg 60 min before the administration of SP resulted in decreased sleeping latency and increased sleeping time. The effect of AECM was comparable to the effect of DZ, a classical benzodiazepine.

The ability of AECM to potentiate pentobarbital-induced hypnosis could be attributed to effects on the central mechanisms involved in the regulation of sleep (Gouernio et al., 1994) or to an inhibition of pentobarbital metabolism (Kaul and Kulkarni, 1978). It is generally accepted that the sedative effects of drugs can be evaluated by measurement of the sleep time induced by pentobarbital in laboratory animals (Carpando et al., 1994; Gamaniel et al., 1998). Our observation that the extract prolonged pentobarbital hypnosis is an indicator of central nervous system depressant activity (Fujimori, 1965). Furthermore, it is well known that these depressant effects are mediated through the GABA/benzodiazepine receptor complex (Petty, 1995). It is therefore possible that the GABAergic system participates in the AECM-induced enhancement of the effects of SP.

The sedative effect of *Clinopodium mexicanum* was confirmed by the observation that administration of AECM caused a dose-dependent reduction in the exploratory behavior and locomotor activity of mice. The effects of AECM and the pentobarbital-induced hypnosis observed in mice after i.p. administration of AECM support our hypothesis that AECM acts as a sedative.

On the other hand, AECM exhibited a partial protection against convulsions induced by PTZ. It increased the threshold of clonic seizures induced by PTZ and delayed the progression to tonic convulsion. However, at doses of 100 and 200 mg/kg, AECM only reduced the incidence of death by 50%.

It has been demonstrated that a neural pathway that contributes to clonic PTZ convulsions is located in the forebrain, and that the brainstem is involved in the network that contributes to tonic PTZ convulsions (Browning et al., 1981; Browning and Nelson, 1986).

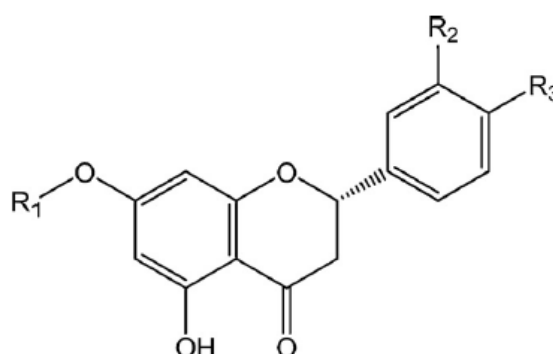
AECM may contain active compound(s) that elevate the threshold of clonic seizure activity initiated in the forebrain and affect propagation of convulsive seizure activity to the brainstem structures (De Sarro et al., 1999; Gale, 1997).

Another possibility is that the increase of the convulsion latency time could be related to a depressant activity toward the CNS. Picrotoxin is a selective non-competitive antagonist of GABA that specifically blocks the GABA-A receptor (Petty, 1995) thereby preventing the neuronal inhibitory effect of GABA and induction of convulsions. AECM was able to delay the onset of seizures induced by picrotoxin, and at a dose of 200 mg/kg, it was also able to completely prevent death produced by picrotoxin. The fact that the extract protected animals against picrotoxin-induced convulsion further suggests that it contains compound(s) that facilitate GABA transmission (Fernández et al., 2004). It is known that PTZ and picrotoxin block the GABA<sub>A</sub> receptor in a similar way nevertheless they show different characteristics that indicate that the domains of their interaction are not identical (Hung et al., 2001). It could explain why AECM showed a partial and not dose-dependent protection against convulsions induced by PTZ while this extract showed a dose-dependent protection against convulsions induced by picrotoxin.

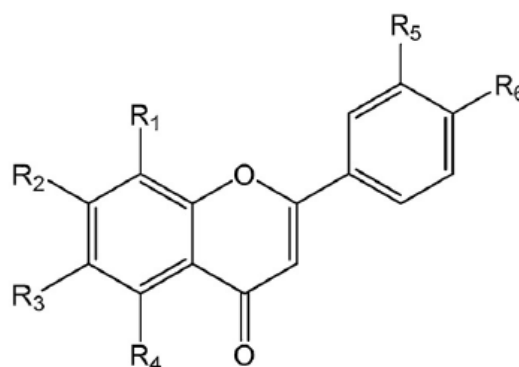
The administration (i.p.) of AECM at 1, 5, 10, and 100 mg/kg suppressed the thermoreceptive response in the hot-plate test. This result was dose-dependent and similar to the effect of ketorolac, a potent analgesic non-selective COX inhibitor that has been reported to be effective in the hot-plate test, and whose activity could be compared to an opioid analgesic compound (Floyd, 1990). However, at a dose of 100 mg/kg, AECM showed a sedative effect and it is therefore possible that the depressant effect of AECM could modify its antinociceptive action. Further studies are needed to clarify this point.

These results provide additional support for the traditional use of *Clinopodium mexicanum* as a remedy for relieving pain. However, further studies are needed for a better evaluation of these activities and to support the potential use of this plant as an analgesic remedy.

A chemical analysis conducted by HPLC-ESI-MS using several flavonoids isolated from the organic extracts as standards showed that AECM contains the flavanone glycosides neoponcirin, poncirin,



Hesperidin	R <sub>1</sub> =hesperidose, R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> =OMe
Neoponcirin	R <sub>1</sub> =hesperidose, R <sub>2</sub> = H, R <sub>3</sub> =OMe
Isonaringin	R <sub>1</sub> =rutinose, R <sub>2</sub> = H, R <sub>3</sub> =OMe
Poncirin	R <sub>1</sub> =neohesperidose, R <sub>2</sub> = H, R <sub>3</sub> =OMe
Naringenin	R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> = H, R <sub>3</sub> =OH
4'-O-Methylnaringenin	R <sub>1</sub> =H, R <sub>2</sub> = H, R <sub>3</sub> =OMe



5-desmethoxy nobiletin	R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = OMe, R <sub>4</sub> =H, R <sub>5</sub> =R <sub>6</sub> =OMe
8-OH-salvigenin	R <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = OMe, R <sub>4</sub> = OH, R <sub>5</sub> =H, R <sub>6</sub> =OMe
Gardenin B	R <sub>1</sub> =R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = OMe, R <sub>4</sub> =OH, R <sub>5</sub> =H, R <sub>6</sub> =OMe

Fig. 4. Chemical constituents of *Clinopodium mexicanum* extracts.

and isonaringin, the flavones 8-OH-salvigenin and gardenin B, and the flavanones naringenin and 4'-O-methylnaringenin.

It has been reported that some flavonoids bind with high affinity to the benzodiazepine site of the GABA<sub>A</sub> receptor (Kahnberg et al., 2002). It is possible that the presence in AECM of several flavonoids, particularly flavonoid glycosides, could account for its effects on the CNS (Fernández et al., 2004).

Toxicity is an important concern in the pharmacological study of novel active compounds in plants. We found that the LD<sub>50</sub> of AECM was 10-fold higher than its highest sedative (hole-board) dose. In interpreting such data, it is possible to infer that the active compound responsible for the sedative effect presents low toxicity.

In conclusion, the present study reveals that a single administration of an aqueous extract of *Clinopodium mexicanum* possesses depressant activity, produces sedative and antithermonociceptive effects in mice, and supports the folk use of *Clinopodium mexicanum* as a remedy to induce sleep and as a tranquilizer. The flavanone gly-

cosides present in the active extract most likely contribute to the sedative effects produced by *Clinopodium mexicanum*, which might involve a GABAergic inhibitory mechanism.

#### Acknowledgments

The authors thank Rubén Luviano Jaramillo and Ana Gabriela Araujo for animal care, Erendira García Ríos and Carmen Márquez. We especially want to express our gratitude to botanist M. García Peña from the Herbario Nacional de México, UNAM, for the plant identification and for providing the required information.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jep.2010.03.012.

## References

- Aguiar, A., Camacho, J.R., Chino, S., Jaquez, P., López, M.E., 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. Instituto Mexicano del Seguro Social, Información Etnobotánica. Instituto Mexicano del Seguro Social, México, p. 110.
- Avula, B., Joshi, V.C., Weerasooriya, A., Khan, I.A., 2005. Liquid chromatography for separation and quantitative determination of adrenergic amines and flavonoids from *Ronculus trilobatus* Raf. Fruits at different stages of growth. *Chromatographia* 62, 379–383.
- Bocek, B.R., 1984. Ethnobotany of Costanoan Indians, California, Based on Collections by John P. Harrington. *Economic Botany* 38, 240–255.
- Browning, R.A., Simonton, R.L., Turner, P.J., 1981. Antagonism of experimentally-induced tonic seizures following a lesion of the midbrain tegmentum. *Epilepsia* 22, 595–601.
- Browning, R.A., Nelson, O.K., 1986. Modification of electroshock and pentylenetetrazole seizure patterns in rats after precollicular transection. *Experimental Neurology* 93, 546–556.
- Carpento, R., Chiarugi, A., Russi, P., Lombardi, G., Carla, V., Pellicciari, R., Moroni, F., 1994. Inhibitors of tyrosine hydroxylase and tyrosinase increase cerebral formation of lymenene and have sedative and anti-convulsant activities. *Neuroscience* 61, 237–243.
- Castilho, P., Liu, K., Rodrigues, A.J., Peio, S., Torri, P., Casanova, J., 2006. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Clinopodium descendens* (Jordan) Sampaio from Madeira. *Flavour and Fragrance Journal* 22, 139–144.
- Chul, Y.K., Hee Ju, L., Mi, K.L., Mi-Jeong, A., Jinwoong, K., 2007. One step purification of flavanone glycosides from *Ronculus trilobatus* by centrifugal partition chromatography. *Journal of Separation Sciences* 30, 2693–2697.
- Cruz, L.S., Rêz-Martínez, N., Pellicer, F., Salazar, I.A., López-Rubalcava, C., 2001. Toluene increases acute thermoreceptive in mice. *Behavioural Brain Research* 120, 213–220.
- Da-yong, Z., Qing, X., Xin-ya, X., Pei-fang, Z., Xin-miao, L., 2006. Identification of O-diglycosyl flavones in *Prunus avium* by liquid chromatography with electrospray ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 42, 441–448.
- De Sarro, A., Cecchetti, V., Frawolini, V., Naccari, P., Tabrini, O., De Sarro, G., 1999. Effects of novel  $\beta$ -desfluoroquinolones and classic quinolones on pentylenetetrazole-induced seizures in mice. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 43, 1729–1738.
- Pernández, S.P., Wasowski, C., Loscardo, L.M., Cranger, R.E., Johnston, C.A.R., Paladini, A.C., Marder, M., 2006. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *European Journal of Pharmacology* 539, 168–178.
- Pernández, S.P., Wasowski, C., Paladini, A.C., Marder, M., 2004. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 77, 399–404.
- Pujimón, H., 1965. Potentiation of barbital hypnosis as an evaluation method for central nervous system depressant. *Psychopharmacology* 7, 374–377.
- Floyd, D., 1990. Characterization of the analgesic activity of letorolac in mice. *European Journal of Pharmacology* 177, 127–135.
- Gale, M.M., 1997. GABA and epilepsy basic concepts from preclinical research. *Epilepsia* 38, 33–512.
- Garniel, K., Amos, S., Akah, P.A., Samuel, B.B., Kapu, S., Olusola, A., Abayomi, A.O., Otegun, I., Wambembe, C., 1998. Pharmacological profile of NIPRD 94/002/1-0. A novel herbal antischistosomal agent. *J. Pharm. Res. Dev.* 3, 89–94.
- García Rivas, H., 2000. Enciclopedia de plantas medicinales Mexicanas Ed. Posada, Mexico, D.F., Mexico, p. 67.
- Crayer, J.R., Veitch, N.C., Kite, G.C., Price, A.M., Kokubun, T., 2001. Distribution of 8-oxygenated leaf-surface flavones in the genus *Ocimum*. *Phytochemistry* 56, 559–567.
- Gouero, P.N., Nguemby-bina, C., Baldt-Moulinier, M., 1994. Some neuropharmacological effects of an ethanolic extract of *Mitrasinet africana* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 62, 57–263.
- Hartley, R.M., Granda, P., 2000. List species of tropical American *Clinopodium* (Labiatae), with new combinations. *Kew Bulletin* 4, 917–927.
- Hirano, T., Gotoh, M., Oka, K., 1994. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life Sciences* 55, 1061–1069.
- Hung, R.Q., Bell-Horner, C.L., Dibas, M.I., Gwey, D.P., Drewe, J.A., Dillon, G.H., 2001. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 298, 986–995.
- Ibrahim, G., Abdulmumin, S., Musa, K.Y., Yam, A.H., 2008. Anticonvulsant of crude flavonoid fraction of the stem bark of *Ficus sycomorus* (Moraceae). *Journal of Pharmacology and Toxicology* 3, 351–356.
- Khan, W., Khatoun, S., 2008. Ethnobotanical studies on some useful herbs of Haramosh and Bugrote valleys in Gilgit northern areas of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 40, 43–58.
- Kahnberg, P., Løge, E., Rosenberg, C., Schougaard, J., Camet, L., Sterner, O., Østergaard Nielsen, E., Nielsen, M., Liljeferds, T., 2002. Refinement and evaluation of a pharmacophore model for flavone derivatives binding to the benzodiazepine site of the GABA<sub>A</sub> receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* 45, 4188–4201.
- Kaul, P.N., Kulkarni, S.K., 1978. New drug metabolism inhibitor of marine origin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 67, 1293–1296.
- Kaul, T.N., Middleton, E.J., Ogra, 1985. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal of Medical Virology* 15, 71–79.
- Kavvadias, D., Sand, P., Youdin, K.A., Qaise, M.Z., Rice-Evans, C., Baur, R., Siegel, E., Rausch, W.D., Rieder, P., Schreier, P., 2004. The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood-brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. *British Journal of Pharmacology* 142, 811–820.
- Lewinsohn, E., Berman, E., Mazur, Gressel, J., 1986. Glucosylation of exogenous flavanones by grapefruit (*Citrus paradisi*) cell cultures. *Phytochemistry* 25, 2531–2535.
- López-Rubalcava, C., Piña-Medina, B., Estrada-Reyes, R., Heinze, G., Martínez-Vázquez, M., 2006. Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimola* in two anxiety paradigms: possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Sciences* 78, 730–737.
- Lortie, D., 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology* 54, 275–287.
- Marder, M., Viola, H., Wasowski, C., Fernández, S., Medina, J.H., Paladini, A.C., 2003. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valerian flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 75, 537–545.
- Martínez-Vázquez, M., Ramírez, A.T.O., Aguilar, M., Bye, R., 1996. Analgesic and antipyretic activities of an aqueous extract and of the flavone Linarin of *Buddleia cordata*. *Planta Medica* 62, 137–140.
- Menon, L.G., Kuttan, R., Kuttan, G., 1995. Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. *Cancer Letters* 95, 221–225.
- Olufunmilayo, O.A., Oroniyi, K.Y., Olayemi, O.A., 2007. Sedative and anticonvulsant activities of the aqueous root extract of *Sansevieria liberica* Gerome & Labroy (Agavaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 113, 111–114.
- Opalchenova, G., Obreshkova, D., 1999. Antibacterial action of extracts of *Clinopodium vulgare* L. Curative plant. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 25, 323–328.
- Petty, F., 1995. GABA and mood disorders: a brief review and hypothesis. *Journal of Affective Disorders* 34, 275–281.
- Tingli, L., Guanghui, X., Wu, L., Chunyu, S., 2007. Pharmacological studies on the sedative and hypnotic effect of salindoside from the Chinese medicinal plant *Rhodiola sachalinensis*. *Phytotherapy* 14, 601–604.
- Venturella, P., Bellino, A., Cusmano, S., 1961. Flavonoid components of citrus. I. Isolation of 5,6,7,8,3',4'-hexanethoxyflavone (nobletin) from *Citrus deliciosa* Tenore. *Annali Chimica* 51, 105–115.
- Viola, H., Wasowski, C., Levi de Stein, M., Wolfman, C., Silveira, R., Dajas, P., Medina, J.H., Paladini, A.C., 1995. Apigenin, a component of *Mitrasinet reticulata* flowers, is a central benzodiazepine receptors–ligand with anxiolytic effects. *Planta Medica* 61, 213–216.
- Woerdenbag, H.J., Mierfort, I., Passteiter, C.M., Schmidt, T.J., Willuhn, G., Van Uden, W., Pras, N., Kampinga, H.H., Konings, A.W.T., 1994. Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from *Azadirachta* species against the GLC<sub>4</sub> and the COLO 320 cell lines. *Planta Medica* 60, 434–437.
- Wu, W., Liu, Z., Song, P., Liu, S., 2004. Structural analysis of selected characteristic flavones by electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Sciences* 20, 1103–1105.

Author's personal copy

Journal of Ethnopharmacology 141 (2012) 908–917



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)

## Neuropharmacological study of *Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae) in mice: Sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract

M. Martínez-Vázquez<sup>a</sup>, R. Estrada-Reyes<sup>b,\*</sup>, A. Martínez-Laurrabaquio<sup>b</sup>, C. López-Rubalcava<sup>c</sup>, G. Heinze<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, México D.F. 04510, México

<sup>b</sup> Laboratorio de Fitofarmacología, Dirección de Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Calzada México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Delegación Tlalpan, 14370 México D.F., México

<sup>c</sup> Departamento de Farmacología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Calzada de los Tenorios 235, Col. Granjas Coapa, CP: 14330, México D.F., México

<sup>d</sup> Departamento de Psiquiatría y Salud Mental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Edificio Fs/m; Circuito Interior y Cerro del Agua, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México D.F. 04510, México

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 December 2011

Received in revised form 12 January 2012

Accepted 17 March 2012

Available online 26 March 2012

#### Keywords:

Anxiety

Sedatives

Foreign hyssop

Toronjil azul

Flavonoids

### ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** *Dracocephalum moldavica* is used as a tranquilizer and as remedy for nervous conditions relief in the Mexican traditional medicine. Despite its intensive use no literature reported neuropharmacological studies on *Dracocephalum moldavica* as yet.

**Aim of the study:** The sedative, anxiolytic-like and antidepressant-like effects of the aqueous extract of aerial parts of *Dracocephalum moldavica* (Lamiaceae) (DM) were evaluated in behavioral models in mice. The general toxic effects of DM were evaluated as well as their chemical analysis was performed.

**Materials and methods:** DM effects were evaluated on pentobarbital-induced sleeping time (SPT), the hole-board (HBT), and the avoidance exploratory behavior (AEBT) tests and on the forced swimming test (FST). General activity and motor coordination were evaluated in the open field (OFT) and Rota-rod tests, respectively. The acute toxicity of DM was determinate by its LD<sub>50</sub> dose. The chemical analyses DM were performed by chromatographic and HPLC–ESI–MS techniques.

**Results:** DM prolonged the pentobarbital-induced sleeping time, induced sedation in the HBT, decreased spontaneous activity and produced motor coordination impairment in mice. However, DM did not show anxiolytic effects in the AEBT or HBT and it was not effective in FST. The DM-treatment produced mortalities with LD<sub>50</sub> = 470 mg/kg body weight.

The HPLC–ESI–MS analysis of DM revealed that (acacetin, apigenin and luteolin)-7-O-β-D-(6'-O-malonyl)-glucoside derivatives are the main compounds of DM.

**Conclusions:** DM induced sedative actions and a general inhibition of CNS activity observed by the decrease of animals' general activity, motor coordination and exploration.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.), a member of the Lamiaceae family, is a grassy annual plant up to 80 cm tall. This species is native to central Asia and is naturalized in eastern and central Europe. Nevertheless it also grows in Egypt, China, Mongolia, and the Himalayas, at altitudes of up to 2700–3100 m above sea level. In these regions it has been used

for ages in folk medicine to treat, mainly, heart disease, blood pressure, angina, atherosclerosis, neuralgia, migraine, headache and toothache (Dastmalchi et al., 2007). Additionally it has been reported, that *Dracocephalum moldavica* extracts possess sedative and analgesic activity (Sultan et al., 2008). This specie has a pleasant smell of lemon and it has been attributed relaxation properties, the analyses of its essential oil revealed the presence of geraniol and citral, which could account for its tranquilizer properties (Holm et al., 1988). In Mexico, *Dracocephalum moldavica* has been adapted to the central region of the country, where nowadays it is systematically cultivated all the year, though it grows in environmental conditions different from those of its native land. In the Mexican traditional medicine, *Dracocephalum moldavica* is known as "toronjil chino, toronjil extranjero, or toronjil azul" (Chinese hyssop, foreign hyssop, and blue hyssop). It is used as mid tranquilizer

\* Corresponding author at: Instituto Nacional de Psiquiatría, Ramón de la Fuente Muñiz, Calzada México Xochimilco No. 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Delegación Tlalpan, Mexico City 14370, Mexico. Tel.: +52 41605080; fax: +52 5556559980.

E-mail addresses: [restrada@imp.edu.mx](mailto:restrada@imp.edu.mx), [est.rosasa@hotmail.com](mailto:est.rosasa@hotmail.com) (R. Estrada-Reyes).

remedy and as sedative agent. However, its main use is as part of a combination with both the “toronjil blanco” (*Agastache mexicana* sp. *xolocotziana*) and the “toronjil morado” (*Agastache mexicana* sp. *mexicana*). This infusion known as “los tres toronjiles” (the three hyssops) is recommend to treat nervous diseases. This plant is also use in other infusions to alleviate nervous disorders. For example, that prepared besides the all three toronjiles, cinnamon (*cinnamomum* sp.), “flor de manita” (*chiranthodendron pentadactylon*) “tila” (*Tentstroemia* spp.), “azhar” (*citrus* spp.) and “hinojo” (*Foeniculum vulgare*) (Linares et al., 1999). However, the use of *Dracocephalum moldavica* adapted in Mexico is merely based on European and Asiatic folklore without any scientific evidence of its efficacy. Despite its intensive use in traditional Mexican medicine, no data on the CNS activity of the aerial parts of *Dracocephalum moldavica* are available.

Taking the above into account, the main objective of this paper was to evaluate the effects on CNS of a *Dracocephalum moldavica* aqueous extract using several behavioral models in mice. Also, we evaluated the acute toxicity of DM and performed the chemical characterization of the main constituents of plant extract.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

Aerial parts of *Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae) were collected in “San José Tlacotitlán, Ozumba, Estado de Mexico”. The botanical identification was carried out by Dr. Robert Bye, a sample of this specie was deposited at the National Herbarium of the Instituto de Biología, UNAM (Voucher No. 1122).

### 2.2. Preparation of aqueous extract of *Dracocephalum moldavica* (DM)

Air-dried and finely ground aerial parts (10 g) of *Dracocephalum moldavica* were extracted with boiling distilled water (90 mL) for 10 min. The resulting solution was lyophilized in a freezer dryer Telstar, at  $-50^{\circ}\text{C}$  and 0.01 mBar, affording the corresponding extract. 1.63 g of aqueous extract of *Dracocephalum moldavica* were obtained per each 10 g of leaves. The extract was stored at  $4^{\circ}\text{C}$  until the pharmacological assays were conducted. The pharmacological assays were carried out with aqueous dissolutions of the aqueous extract of *Dracocephalum moldavica*. The doses are expressed as mg/kg of DM body weigh per mouse.

### 2.3. Preparation of organic extracts

The aerial parts of *Dracocephalum moldavica* L. (500 g) were dried at room and extracted several times with hexane, ethyl acetate (EtOAc), and methanol (MeOH) successively at room temperature. The extracts were concentrated under reduced pressure at  $40^{\circ}\text{C}$  yielded 10, 7, and 22 g of dried extracts, respectively. Each extract was separated using an open column packed with 60 G F<sub>254</sub> Merck silica gel at a proportion of 1:15 with respect to the extract. In each case, elution began with hexane followed by mixtures of hexane and EtOAc of increasing polarity until 100% EtOAc. Then it was eluted with mixtures of EtOAc and MeOH with increasing polarity to end with MeOH. A  $\beta$ -sitosterol and stigmaterol mixture as well as ursolic acid were identified as the major components of hexane extract. While from the EtOAc extract it was possible to isolated acetin and the anxiolytic flavone apigenin as well as an oleanolic and ursolic triterpenic acids mixture. Whereas, acetin-7-O-glucoside (syn. tilianine) and acetin 7-O-(6'-acetyl) glucoside (syn. agastachoside) (10) were obtained as major components from MeOH extract, additionally sitosterol-3-O-glucoside (syn. daucosterol) was also isolated. The polar fractions from MeOH extract

chromatography, that showed similar profile in TLC were reunited and separated by sephadex LH-20 column chromatography with a mixture of EtOH–H<sub>2</sub>O (1:1) as developing solvent, isolating acetin 7-O- $\beta$ -D-(6'-O-malonyl)-glucoside (9), daucosterol, glucose and fructose. The structures of the isolated compounds were assigned by analysis of its physical and spectroscopic properties and by comparison with the described in the literature. The compounds isolated from the organic extracts were used as standards in the HPLC-ESI-MS analysis of DM.

### 2.4. Chemical characterization of DM

In order to identify the main constituents of the aqueous extract of DM a analytical method was developed using high performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). For the identification of flavonoids aglycones and glycosides, photodiode array detection (PAD) was also used. The analysis was carried out with an analytical HPLC Waters model 600 equipped with a Synergi Polar-RP 150 cm  $\times$  2.0 mm, and ID = 4  $\mu\text{m}$  column and a Waters 996 photodiode array (PDA) detector coupled to an ion trap mass spectrometer Bruker Esquire 6000 model. The mobile phase was an acetonitrile–water solvents system (10:90, v/v at 0 min to 100 (v/v) at 30 min); flow-rate was 0.2 mL/min, injection volume of 5  $\mu\text{L}$  of DM in water. The entire analysis was performed at  $25^{\circ}\text{C}$ , and the detection wavelength was set at 254 nm. A positive ion mass spectra of the column eluent were recorded in the range of  $m/z$  150–1000 amu with a scan cycle time of 2 s. ESI-IT source conditions were adjusted as follow: drying N<sub>2</sub>, the capillary temperature to  $350^{\circ}\text{C}$ , the spray voltage was set to 40.0 V, auxiliary gas pressure = 30 psi, dry gas 10 L/min (Wu et al., 2004; Estrada-Reyes et al., 2010).

The compounds of the active extract were identified and quantified by comparison of their retention time (RT), HPLC peak, and  $M^+$ , with the previously isolated compounds from organic extract of *Dracocephalum moldavica*. The HPLC peak areas were not corrected for response factors and are reported as the relative percentage of area.

Total flavonoids content in the lyophilized extract of DM 0.01 g of DM was used to determinate the total flavonoids content in DM by spectrophotometric technique as described in Brazilian Pharmacopeia (2002). The analysis was made in a spectrophotometer Bio Mate 3 (Thermo Electron, Corporation, USA). Only those values of the mean of three determinations, with an acceptable coefficient of variation less than 5% were taken into account.

In order to determinate of sugars content of DM an HPLC analysis carried out with an analytical HPLC Waters model 600, equipped with a Zorbax carbohydrate column with 15 cm  $\times$  I.D. = 4.6 mm, size particle = 5  $\mu\text{m}$  and a Water refraction index detector (RID). At initial temperature  $35^{\circ}\text{C}$ , using as mobile phase acetonitrile/water mixture (8:2, v/v) and a flow rate of 1.4 mL/min, injection volume of 1 mg/mL in water. The sugars were identified from comparison of RT and co-injection with standard compounds.

Essential oils of fresh leaves of DM were analyzed by GC–MS system. Identification of constituents was based in their retention time (RT; min) and on mass spectral fragmentation analysis as well as using of library of National Institute of Standards and technology (NIST 3.0), and by comparison of their spectra fragmentation with the described in the literature data (Estrada-Reyes et al., 2004).

### 2.5. Animals

Adult male Swiss-Webster mice (20–30 g) were housed eight per cage in a temperature-controlled ( $20$ – $21^{\circ}\text{C}$ ) room under inverted light/dark conditions (12 h light/dark cycle, lights turned on at 22:00 h). All behavioral evaluations were performed between 10:00 and 14:00 h. Animals had *ad libitum* access to Purina rodent



chow and water. All animals were handled in agreement with the general principles of laboratory animal care (NIH publication # 85-23, revised in 1985) and the 'Norma Oficial Mexicana' (NOM-062-ZOO-1999). Additionally the experimental protocol was approved by the local Ethical Committee. All of the experimental sessions were videotaped and analyzed by a blind observer who was unaware of the treatment conditions.

## 2.6. Drugs

All drugs were bought from Sigma–Aldrich (Toluca, México) and were intraperitoneally injected in a total volume of 10.0 mL/kg. DM, diazepam (DZ), pentobarbital (SP), imipramine hydrochloride (IMI), and clomipramine hydrochloride (CMI), were dissolved in saline solution (0.9%). The pharmacological assays were performed with aqueous dilutions to 0.9% NaCl of the extracts containing 2% Tween 80. Doses are expressed as milligrams of dry extract per kilogram of body weight for each mouse.

## 2.7. Sodium pentobarbital-induced sleeping time (SPT)

The hypnotic effect of DM alone or in combination with sodium pentobarbital (SP) was evaluated. For this purpose, a total of 64 mice were divided into eight groups ( $n = 8$ ). The first group served as control and was injected with the vehicle; while the four other groups received the DM (1, 10, 100 or 200 mg/kg i.p., respectively) 60 min before the administration of 42 mg/kg (i.p.) of SP. Three independent groups were administered with DZ at 0.5, 1 and 2 mg/kg, i.p., 30 min before the administration of SP (42 mg/kg), these groups served as a positive control group, and a vehicle-treated group was used as control.

In the second part of the experiment, mice were treated with DM (1, 10, 100, or 200 mg/kg,  $n = 8$  each, –60 min) or DZ (1 mg/kg, –30 min) before the administration of a sub threshold dose of SP (30 mg/kg), one more group was administrated with vehicle in combination with 30 mg/kg of SP and serve as a reference group. Each mouse was placed on a warm table and was carefully observed for the onset of uncoordinated movements corresponding to the sedative phase (sedation latency; SL) and the time elapsed from the loss to regaining of the righting reflex were recorded (sleeping time; ST) (López-Rubalcava et al., 2006; Tingli et al., 2007).

## 2.8. Hole-board test (HBT)

The hole-board set-up apparatus is a wooden box of 60 cm × 30 cm × 30 cm, with four equidistant holes (2 cm diameter) on the floor. Light intensity during the testing ranged from 270 to 300 lx. Independent groups of mice ( $n = 8$ ) were intraperitoneally administered with 1, 10, 100 or 200 mg/kg of the aqueous extract. After 60 min, each mouse was placed in the center of the hole-board and the number of head dips into a hole, as well as the number of rearings, was recorded over a 5 min period. A head dip was registered if a mouse put its head in a hole at least up to eye level; repeated dips into the same hole were not counted unless these were separated by locomotion. Rearing was scored when a mouse raised itself up on its hind legs with its fore paws resting on a partitioned wall. One independent group of ( $n = 8$ ) received DZ (2 mg/kg) 30 min before the test was conducted; this group served as a reference standard. Another group of mice received only the vehicle and served as a negative control. After each trial, the floor of the apparatus was carefully cleaned to remove any traces of previous tests. An increase in the number of head dips and the frequency of rearing compared to the controls was considered to indicate an anxiolytic-like effect, while any decrease in these variables was considered

to be the result of a sedative effect (Viola et al., 1995; Sousa et al., 2004; Estrada-Reyes et al., 2010).

## 2.9. Avoidance exploratory behavior test (AEBT)

This model was initially used to screen new anxiolytic drugs and consists of an acrylic chamber (44 cm × 21 cm × 21 cm) divided into a small, darkened compartment and a large and highly illuminated (light intensity 560 lx.) compartment. An opening of 13 cm × 15 cm separates the dark from the bright area. At the beginning of the test, each mouse is introduced into the bright compartment and the number of transitions from one side to the other is recorded for 10 min. An increase in this parameter is interpreted as an anxiolytic-like effect (Crawley and Goodwin, 1980; Crawley and Davis, 1982). The test chamber was carefully cleaned after each recording. In order to prevent behavioral changes of the animals after the first experience, mice were tested only once in this test.

## 2.10. Open field test (OFT)

The open field test involves an apparatus made from an opaque-Plexiglas box (40 cm × 30 cm × 20 cm) with the floor divided into 12 equal squares. Each animal was gently placed in a corner of the apparatus, and its behavior was videotaped during a 5 min session. A blind observer registered the number of times the animal entered each square (counts per 5 min) was recorded (López-Rubalcava et al., 2006). In this test, the aqueous extract was administered at doses of 1, 5, 10, 50, or 100 mg/kg (i.p.) to five independent groups ( $n = 8$ ), 60 min before the beginning of the test. Six independent groups treated with DZ (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 mg/kg) were used as positive control.

## 2.11. Motor coordination

The effect on motor coordination was assessed using Rota-rod apparatus. In brief, mice were trained to remain for 5 min on the rod rotating at speed of 22 rpm. On the next day, DM (1, 10, 50, 100, and 200 mg/kg), vehicle, or DZ (2 mg/kg) were administered and the ability of mice to remain on the rotating rod was assessed before and 60 min after the DM administration. For each animal, the riding time on the rotating rod was registered (Farkas et al., 2005; Estrada-Reyes et al., 2010a).

## 2.12. Antidepressant-like effect in the forced swimming test (FST)

Mice were individually placed in glass cylinders (height: 21 cm, diameter: 14.5 cm) containing 15 cm of water at  $23 \pm 1$  °C. All animals were forced to swim for a 15 min period (pre-test), followed by a 3-min session (test) at 24 h later (Murakami et al., 2009).

On this basis, seven independent groups of mice ( $n = 8$  per group) were used in this experiment. Five groups were injected with DM at 0, 1, 10, 100, or 200 mg/kg (i.p. –60 min before the test) while two independent groups were used as positive controls receiving imipramine (IMI) at 25 mg/kg (i.p. –30 min before the test) and clomipramine (CMI) 32 mg/kg (i.p. –30 min before the test).

After the swimming sessions, mice were removed from the cylinder, carefully dried, placed in heated cages for 20 min and then returned to their home cages. All test sessions were videotaped and afterwards the immobility time accumulated during time test was registered by an observer that was unaware of the pharmacological treatments (Porsolt et al., 1977a,b; Xu et al., 2005; Schürmann da Silva et al., 2006).

### 2.13. Acute toxicity study (LD<sub>50</sub>)

The LD<sub>50</sub> of the extract was determined by Lorke's method (Lorke, 1983). Briefly, in the first stage, the aqueous extract was intraperitoneally administered at doses of 10, 100, or 1000 mg/kg to three groups ( $n = 3$ ). The animals were observed for 1 h for signs and symptoms of toxicity. Later observations were made every 24 h for 7 days. In the second phase, doses of 1600, 2900, or 5000 mg/kg were administered to three groups of three, four, and five animals, respectively. These mice were carefully observed until their total recovery or death. The surviving animals were observed for 14 days in order to record mortality.

### 2.14. Statistics

Data was analyzed with the Kruskal–Wallis analysis of variance on ranks ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ , and  $***p < 0.001$ ) followed by the Mann–Whitney rank sum test. All statistical analyses were carried out using the Sigma Stat Program (version 3.5, Jandel Scientific), and graphics were generated using the Sigma Plot Program (version 10.0, Jandel Scientific).

## 3. Results

### 3.1. Anxiolytic and/or sedative effects of DM in the HBT and in the AEBT and OFT

The hole-board test is well-established as a means to assay potential anxiolytic and/or sedative effects. A single i.p. administration of DM given to mice at doses of 1, 10, 100, and 200 mg/kg caused a marked reduction in head-dip responses as shown in Fig. 1 ( $H = 28.4$ ,  $df = 7$ ,  $p = 0.002$ ). Also, a decrease in the number of rearing ( $H = 28.4$ ,  $df = 7$ ,  $p = 0.002$ ), as well as the head dipping time ( $H = 27.2$ ,  $df = 7$ ,  $p = 0.003$ ) relative to the control group was observed. Like diazepam-treated (2 mg/kg) group, DM-treated (100 and 200 mg/kg) mice showed a significant decrease ( $***p < 0.001$ ) in the head dips and the rearings, and also induced a significant decrease on the spontaneous motor activity in the OFT (Fig. 2).

The effects of DM in the mouse in the anxiety paradigm AEBT are shown in Fig. 2. As it can be observed, the plant extract significantly decreased the number of transitions between the dark and the bright compartments in a dose dependent fashion.  $H = 33.08$ ,  $df = 5$ ,  $p \leq 0.001$ . Similarly to the effects observed in the AEBT, in the open field test, DM significantly decreased the number of counts recorded in a 10 min period ( $H = 33.37$ ,  $df = 5$ ,  $p \leq 0.001$ ) (Fig. 2). The treated group with DZ to lower doses at 1.0 mg/kg produced an increase in the number transitions and to major dose it produced a significant decrease in the number transitions of similar form of DM ( $H = 21.76$ ,  $df = 6$ ,  $p \leq 0.001$ ) in the AEBT and in the OFT the DZ-treated only to the dose 2.0 mg/kg produced a significant reduction in the locomotor activity of the animals tested ( $H = 11.59$ ,  $df = 6$ ,  $p = 0.04$ ) (Fig. 2).

### 3.2. Sedative effect of DM in the SPT

The method of pentobarbital-induced sleeping in mice is a classic pharmacological experiment for the screening of sedative-hypnotic drugs. Table 1 shows the effect on the sodium pentobarbital-induced hypnosis of both diazepam (0.5, 1.0, and 2 mg/kg) and the DM (1, 10, 100 and 200 mg/kg). DM was tested alone, and in combination with SP (30 or 42 mg/kg). At the doses tested, the extract *per se* did not induced sleep. However, the duration of sleeping time produced by SP (42 mg/kg) was significantly prolonged in those animals pre-treated with DM (100 or 200 mg/kg) ( $H = 60.48$ ,  $df = 7$ ,  $p < 0.001$ ), and the sedation latency of

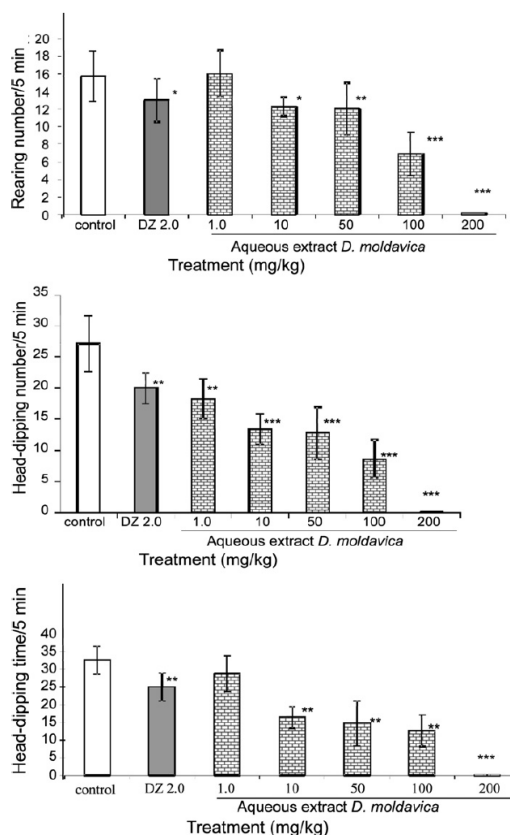


Fig. 1. Effects of acute administration of aqueous extract of DM in the hole-board test.

mice was significantly shortened ( $H = 26.51$ ,  $df = 7$ ,  $p < 0.001$ ). Furthermore, when animals were pretreated with 100 or 200 mg/kg of DM dose and a sub-anesthetic dose of pentobarbital (30 mg/kg), insufficient by itself to induce loss of the righting reflex, the animals showed significant prolongation of the sleeping time ( $***p < 0.001$ ) with all the doses of DM tested ( $H = 8.136$ ,  $df = 5$ ,  $p \leq 0.05$ ). Even more this effect was higher than that those produced by the combination of SP (30 mg/kg) and 1 mg/kg of DZ. These results indicate that DM, similarly to DZ, exerts a CNS depressant effect in mice.

### 3.3. Effect of DM on motor coordination in the Rota-rod test

In the Rota-rod test, the fall-off time of treated animals, at the doses of 10, 100 and 200 mg/kg of DM and 2 mg/kg of DZ, significantly was reduced in comparison to control group (Table 2). Animals treated with lower doses remained on the rotating rod all test time.

### 3.4. Effect of DM in the FST

The results of DM in the FST are shown in Fig. 3, data indicate that IMI (25 mg/kg) and CMI (32 mg/kg) significantly reduced the immobility time in comparison with the control group (Mann–Whitney

**Table 3**  
Constituents of essential oil of *Dracocephalum moldavica* L.

Compound	Formula	Abundance relative (%)	Retention time (min)	Ion molecular (M <sup>+</sup> )
–		0.382	13.2	206
–		0.631	15.25	206
Citral	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	29.96	16.7	152
Geraniol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	55.627	17.38	154
Acetate ( <i>E</i> )-geraniol	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	9.553	19.84	196
		2.001	22.23	
Total		96.15		

Identification of constituents was based on mass spectral fragmentation analysis and using of library of National Institute of Standards and technology (NIST 3.0), and by comparison of their spectra fragmentation with the described in the literature data.

2 h until death. In the second phase of the test, two groups of three animals were administered at 370 and 600 mg/kg of DM, respectively, in the first group some toxic manifestations were observed; the animals became remarkably quiet and there was a considerable decrease in locomotor activity and flaccid-body was observed which lasted nearly for 1–2 h. Whereas in the second group all animals died. The adopted method estimates LD<sub>50</sub> by calculating the geometric mean of the dose that caused 100% mortality and the dose which caused no lethality at all. The LD<sub>50</sub> = 470 mg/kg indicates that DM is toxic, according to Lorke's classification.

### 3.6. Phytochemical study of organic extracts of DM

The phytochemical study of the organic extracts, of this plant species led to the isolation and identification of acacetin (11), apigenin, 8-hydroxy-salvigenin (16) (syn. pedunculine), and luteolin flavones, as well as four flavone glucosides, acacetin-7-β-O-glucoside (syn. tilianine), acacetin 7-β-D-O-(2''-acethyl) glucoside, acacetin 7-β-D-O-(6''-acethyl)-glucoside (syn. agastachoside) (10) and acacetin 7-O-β-D-(6''-O-malonyl)-glucoside (9). Four terpenoids-type compounds: β-sitosterol and stigmasterol mixture, oleanolic and ursolic acids mixture and the glucoside of sitosterol: sitosterol-3-β-O-glucoside (syn. daucosterol) were isolated. Finally, two sugars were isolated in abundant amounts from methanol extract: glucose (35% with respect to extract's dry weight) and sucrose (30% with respect to extract's dry weight) and the ferulic acid were also obtained. These compounds were identified by their physical and spectroscopic properties, and by comparison with published data. They were used as standards for the chemical analysis of DM.

As shows Table 3, the GC-MS analysis of essential oils of fresh leaves of *Dracocephalum moldavica* led to the identification of citral (29.96%, relative area), geraniol (55.62%, relative area) and acetate (*E*)-geraniol (9.55%, relative area) together account for about 96.15%

of the oil. Monoterpene hydrocarbons are present only in trace amounts. Interesting, unlike the organic extract content, the essential oils content was similar to that reported for the Asian and the European's species of *Dracocephalum moldavica* (Holm et al., 1988; Abd El-Baky and El-Baroty, 2008), only one specie is different in its neral and neryl acetate content, which are present during the reproductive stage of *Dracocephalum moldavica* native of Hungary, but these were not detected in the specie studied in this paper (Kakasy et al., 2002).

### 3.7. Chemical analysis of active aqueous extract of *Dracocephalum moldavica* aerial parts

Determination of flavonoids total and general chemical screening of the aqueous extract of *Dracocephalum moldavica* leaves.

On the other hand, the crude extract yielded 1.63 g of aqueous extract of *Dracocephalum moldavica*, corresponding to 16.3% of dried plant. Total flavonoid content was expressed as a percentage of total flavonoids calculated as quercetin (average ± SEM): DM, 16.6 ± 0.032%. Additionally, DM tested positive for sugars, saponins, polyphenols, tannins, flavonoids, sterols, and was not found to contain alkaloids-type compounds.

### 3.8. Chemical analysis of aqueous extract of *Dracocephalum moldavica* aerial parts by HPLC-ESI-MS

The determination of the chemical composition of DM was achieved using the conditions stated in the experimental section. The results showed that acacetin 7-O-β-D-(6''-O-malonyl)-glucoside (9) (14.11% of relative area), luteolin 7-O-β-D-(6''-O-malonyl)-glucoside (4) (5.91% of relative area), and apigenin 7-O-β-D-(6''-O-malonyl)-glucoside (6) (4.52% of relative area), and acacetin 7-β-D-glucuronide (8) (10.30% of relative area) were the main components of DM. 8-Hydroxy-salvigenin (16), diosmetin

**Table 4**  
Major components identified in aqueous extracts of *Dracocephalum moldavica* aerial parts.

No.	Compounds	RT (min)	M <sup>+</sup>	Formula	%Abundance
1	6-Malonyl-arbutine	2.8	358 + 23	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	4.44
2	No identified	4.7	–	–	3.02
3	Diosmetin 7-β-O-glucoside	13.9	462	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	9.73
4	Luteolin 7-O-β-D-(6''-O-malonyl)-glucoside	14.7	534	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>14</sub>	5.91
5	3-methoxyacacetin 7-O-β-D-glucuronide	15.1	476	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	2.89
6	Apigenin 7-O-β-D-(6''-O-malonyl)-glucoside	15.7	518	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>	4.52
7	Diosmetin 7-O-β-D-(6''-O-malonyl)-glucoside	15.9	548	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>14</sub>	5.68
8	Acacetin 7-O-β-D-glucuronide	17.0	460	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	10.30
9	Acacetin 7-O-β-D-(6''-O-malonyl)-glucoside	17.7	532	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>13</sub>	14.11
10	Acacetin 7-β-O-(6''-acethyl)-glucoside	19.0	488	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	1.52
11	Acacetin	24.5	284	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	0.1
12	Diosmetin	26.5	300	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	2.33
13	Gardenin A	27.6	418 + 23	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	3.54
14	Flavone no identified, possibly: 5,6,7,8,3'-pentahydroxy, 4'-methoxy flavone	28.1	332	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	0.69
15	No identified	28.9	–	–	0.50
16	8-Hydroxy-salvigenin	28.5	344	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	5.64
17	Flavone no identified, possibly: 5, 6, 8, 3'-tetrahydroxy, 4', 7-dimethoxyflavone	28.8	346	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	1.24



**Table 1**

Sedative and hypnotic actions of DM and diazepam (DZ) in combination with 42 and 30 mg/kg of sodium pentobarbital (SP).

Treatment (mg/kg)		SL (min)	ST (min)
SP42	Vehicle	1.61 ± 0.11	16.38 ± 1.18
SP42	DM1.0	1.33 ± 0.13	17.27 ± 1.47
SP42	DM10	1.25 ± 0.17	14.02 ± 1.71
SP42	DM100	1.23 ± 0.14	45.28 ± 1.52***
SP42	DM200	1.17 ± 0.11	88.72 ± 2.20***
SP42	DZ0.5	1.43 ± 0.18	77.45 ± 3.38***
SP42	DZ1.0	2.04 ± 0.20	87.19 ± 4.00***
SP42	DZ2.0	0.851 ± 0.08	93.25 ± 2.86***
		$H=26.51, df=7, p \leq 0.001$	$H=60.48, df=7, p \leq 0.001$
SP30	Vehicle	1.39 ± 0.07	0
SP30	DM1.0	1.52 ± 0.095	0
SP30	DM10	1.34 ± 0.07	0
SP30	DM100	1.43 ± 0.08	13.33 ± 1.23***
SP30	DM200	1.54 ± 0.07	22.304 ± 1.295***
SP30	DZ 1.0	1.51 ± 0.102	18.85 ± 1.26***
		$H=26.90, df=5, p \leq 0.001$	$H=8.136, df=5, p \leq 0.043$

Effect of DM and DZ on sedative latency (SL), and sleeping time (ST) induced by SP at 42 and 30 mg/kg (SP42, SP30, respectively). All of the results were expressed as the averages ± S.E.M. of groups of 8–10 animals each. Comparisons were made by using a Kruskal–Wallis one way analysis of variance on ranks, followed by Mann–Whitney U-test: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

rank sum test;  $T=155.0, n=10, p \leq 0.001$  for IMI and  $T=155.0, n=10, p \leq 0.001$  for CMI). Unlike to both, IMI and CMI, DM produced an increase in the immobility time at the doses of 100 and 200 mg/kg, inducing helpless-like behavior in the mice ( $H=55.59, df=4, p < 0.001$ ), while the doses of 1 and 10 mg/kg had no effect.

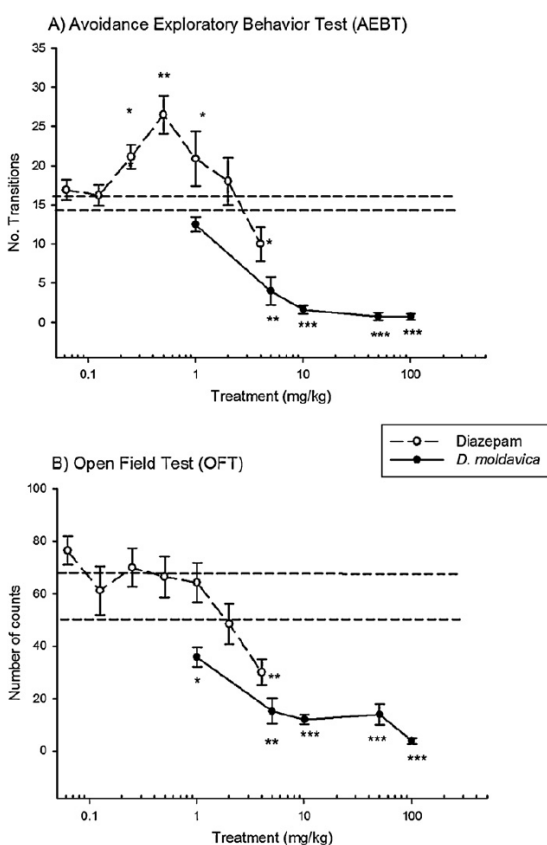


Fig. 2. Effect of DM on the OFT and AEBT.

**Table 2**

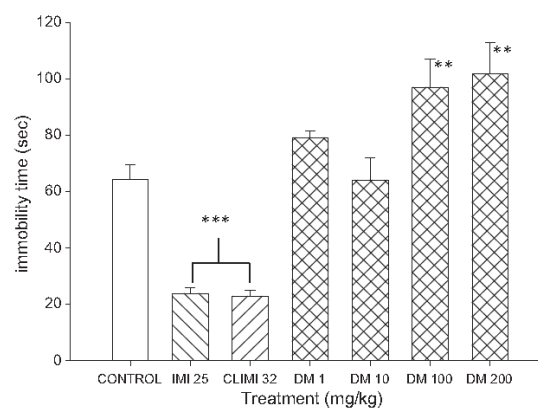
Effect of a single ip. administration of the DM on the motor coordination.

Treatment (mg/kg)	Fall-of time (s)
Control	>300
DZ 2	139.2 ± 15.69
DM	
DM 1	>300
DM 5	>300
DM 10	125.3 ± 12.5
DM 100	73.5 ± 9.77
DM 200	50.75 ± 10.6

These results indicated that DM induces a depressant effect in mice tested in this paradigm.

### 3.5. Acute toxicity testing

On the other hand, DM was toxic ( $DL_{50} = 470$  mg/kg) according to Lorke's classification when it was intraperitoneally administered. At doses 1000 mg/kg, some adverse effects, such as diarrhea, diaphoresis, positive piloerection, and ataxia were immediately seen after administration, these toxic manifestations persisted for

Fig. 3. Effect of a single ip. administration of aqueous extract of *Dracocephalum moldavica* aerial parts on the immobility time in the forced swimming test.

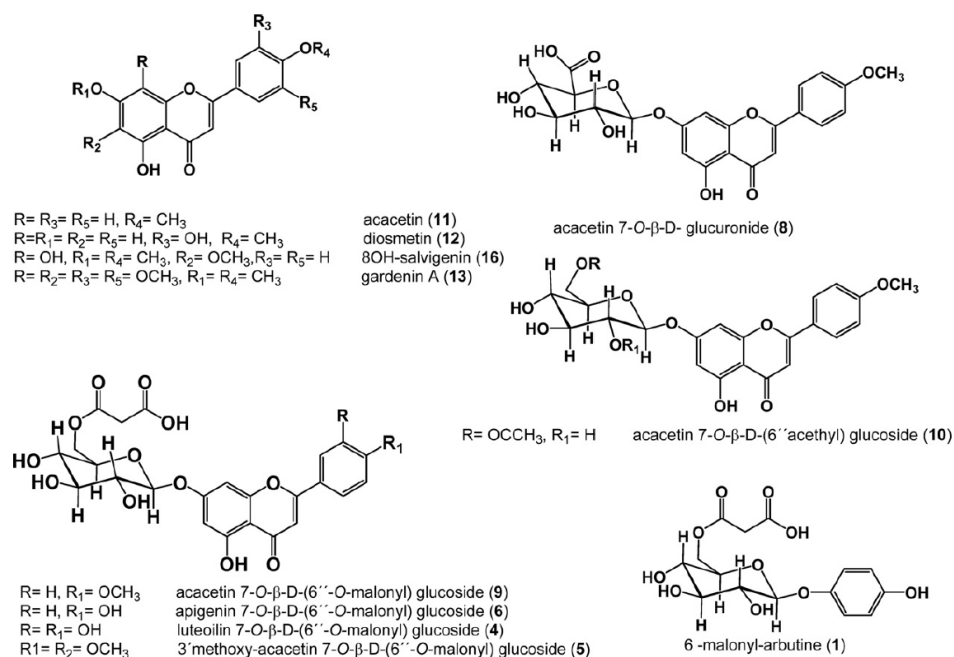


Fig. 4. Structural formulae of the major components identified in the aqueous extract of *Dracocephalum moldavica* aerial parts.

(12), gardenin A (13), and two flavonoid-type compounds (14) and (17) that unfortunately were not fully identified, 6- $\beta$ -O-malonyl-arbutine (1; 4.44%) was also detected, whereas acacetin (11) was only detected in trace, apigenin and luteolin could not be detected, presumably because of their decomposition during the extraction process. Fig. 4 shows the formulae of the compounds identified and Table 4 shows the main compounds identified in DM. The numerical order of compounds corresponds to the retention time (RT) in HPLC elution ascending order.

The full-scan mass spectrum and the ion mass spectra of the flavonoid compounds present in DM can be consulted in the complementary material of this paper.

### 3.9. Sugars compounds present in the DM

The identification of saccharide compounds in DM was carried out by HPLC analysis. As it is represented in Table 5, the results

Table 5  
Identification of major sugars in aqueous extract of *Dracocephalum moldavica* leaves.

Peak	Retention time (min)	Compound	%Relative area
1	3.050	Xylose	18.21
2	3.667	Fructose	36.25
3	4.067	Glucose	9.80
4	4.350	No identified	7.28
5	6.433	Sucrose	19.10
6	7.550	Maltose	9.33
%Total			90.77

All of the results were expressed as the averages  $\pm$  S.E.M. of groups of 16–18 animals each. Comparisons were made by using a Kruskal–Wallis one way analysis of variance on ranks, followed by Mann–Whitney *U*-test: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Kruskal–Wallis:  $H = 55.59, df = 6, p < 0.001$ . Mann–Whitney: CMI vs control:  $T = 155, p \leq 0.001$ ; CLMI vs control:  $T = 155, p \leq 0.001$ .

showed that the aqueous extract have a high content of sugars compounds, with a 22.1% of abundance with respect to weight of dry leaves. The presence of xylose (18.21% of relative area), fructose (36.25% of relative area), glucose (9.80% of relative area), sucrose (19.10% of relative area) and maltose (9.33% of relative area) sugars, and only one sugar with 7.20% of relative area was not identified.

### 4. Discussion

A survey in the literature pointed out that *Dracocephalum moldavica* L. is used as a food ingredient, as a tea, and as an herbal remedy for the treatment of stomach and liver disorders, headaches and congestion (Sultan et al., 2008). It also has been used as an antioxidant agent as well as by its cardio protective and vasodilative effects (Dastmalchi et al., 2007; Najafi et al., 2009). However few reports have been published regarding to the sedative effect of *Dracocephalum moldavica* (Naghibi et al., 2005; Sultan et al., 2008); furthermore, to our knowledge there are no reports about a pharmacological study on the sedative or anxiolytic effects of *Dracocephalum moldavica*. Taking these account, the aim of the present study was evaluate the neuropharmacological effects produced by an aqueous aerial parts of *Dracocephalum moldavica* (DM) in several behavioral models.

According to our results, DM significantly decreased in a dose depend fashion the number of transitions in the avoidance exploratory behavior test (AEBT). This effect could be considered as an anxiogenic-like action; however, DM at the same doses also induced a significant reduction in general activity of mice tested in the open field test (OFT) in comparison to the control group. Therefore this behavior cannot be considered as an anxiogenic-like effect but it is a consequence of the diminution of the ambulatory activity, due to their sedative action (López-Rubalcava et al., 2006). These results are similar to those observed with a high dose of diazepam

board, thiopental induced sleeping time and locomotor activity tests (Jäger and Saaby, 2011). Then the presence in DM of the flavonoid glycosides: acacetin 7-O- $\beta$ -D-(6''-O-malonyl)-glucoside (9), luteolin 7-O- $\beta$ -D-(6''-O-malonyl)-glucoside (4), apigenin 7-O- $\beta$ -D-(6''-O-malonyl)-glucoside (6) and acacetin 7- $\beta$ -D-glucuronide (8) could account for the depressant effect of DM. Furthermore it has been reported the sedative effect of luteolin (Coleta et al., 2008).

Another aim of the present study was evaluate the possible toxic risks of aqueous extract of *Dracocephalum moldavica* aerial parts. To accomplish this goal, the acute toxicity resulting from the intraperitoneally administration of DM was measured according to Lorke's method. As mentioned in the result section, at higher doses (500–1600 mg/kg) toxic manifestations persisted until death in a period of 36 h, being the LD<sub>50</sub> = 470 mg/kg body weight. The acute toxicity implies that the intake of DM could involve light health risks.

Concluding, our results indicate that DM possess sedative actions, decreases locomotor activity and produces muscle-relaxation in experimental animals. These effects precluded the possible anxiolytic-like and antidepressant-like actions. Taken together these data indicated that the aqueous extract produced a general inhibition of neuronal activity in the CNS. The flavone glycosides present in the active extract most likely contribute to the sedative effects produced by *Dracocephalum moldavica*. Due to the fact that are well-known the sedative but not anxiolytic-like effects of some flavonoid glycosides isolated of plants used in the traditional medicine as sedatives (Fernández et al., 2004, 2006). However, future studies should be undertaken to address this possibility.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank Rubén Liviano Jaramillo for assisting in the animal care and Erendira García Ríos and Carmen Márquez and Isabel Beltrán Villalobos for technical assistance. Partial support came from project No. 190 of Fondo de apoyo para proyectos de Investigación (NC093620.0) del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz and Conacyt No. 155255 (for CL-R).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jep.2012.03.028.

#### References

- Abd El-Baky, H.H., El-Baroty, G.S., 2008. Chemical and biological evaluation of the essential oil of Egyptian moldavian blam (*Dracocephalum moldavica* L.). *International Journal of Integrative Biology* 3, 202–208.
- Awad, R., Ahmed, F., Bourbonnais-Spear, N., Mullally, M., Ta, C.H., Tang, A., Merali, Z., Maquin, P., Caal, F., Cal, V., Poveda, L., Sanchez, V.P., Trudeau, L.V., Amason, T.J., 2009. Ethnopharmacology of Q'eqchi' Maya antiepileptic and anxiolytic plants: effects on the GABAergic system. *Journal of Ethnopharmacology* 125, 257–264.
- Borsini, F., Meli, A., 1988. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology* 97, 147–160.
- Brazilian Pharmacopeia, 2002. *Brazilian Pharmacopeia Convention*, 4th ed. Atheneu, São Paulo, Fascicle 5, p. 268.
- Briónes-Aranda, A., Rocha, L., Picazo, O., 2005. Alterations in GABAergic function following forced swimming stress. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 80, 463–470.
- Budantsev, A.L., Shavarda, A.L., Medvedeva, N.A., 1994. The role of the Labiatae in the vegetable resources of the USSR. *Lamiales Newsletter* 3, 11–12.
- Coleta, M., Campos, M.G., Cotrim, M.D., Lima, T.C.M., Cunha, A.P., 2008. Assessment of luteolin (3,4',5,7-tetrahydroxyflavone) neuropharmacological activity. *Behavior Brain Research* 189, 75–82.
- Crawley, J., Goodwin, F.K., 1980. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 13, 167–170.
- Crawley, J., Davis, L.G., 1982. Baseline exploratory activity predicts anxiolytic responsiveness to diazepam in five mouse strains. *Brain Research Bulletin* 8, 609–612.
- Christ, B., Kesselring, K., 1982. Process for isolating rosmarinic acid from plants. United State Patent: 4,354,035. Assignee: A. Nattermann & Cie GmbH.
- Dastmalchi, K., Dorman, D., Kosar, M., Hiltunen, R., 2007. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. *LWT Food Science and Technology* 40, 1655–1663.
- Estrada-Reyes, R., Aguirre Hernández, E., García-Argáez, A., Soto, H.M., Linares, E., Bye, R., Heinze, G., Martínez-Vázquez, M., 2004. Comparative chemical composition of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*. *Biochemical Systematics and Ecology* 32, 685–694.
- Estrada-Reyes, R., Martínez-Vázquez, M., Gallegos-Solis, A., Heinze, G., Moreno, J., 2010. Depressant effects of *Clinopodium mexicanum* Benth. Govaerts (Lamiaceae) on the central nervous system. *Journal of Ethnopharmacology* 130, 1–8.
- Estrada-Reyes, R., López-Rubalcava, C., Rocha, L., Heinze, G., González, E.A.R., Martínez-Vázquez, M., 2010a. Anxiolytic-like and sedative actions of *Rollinia mucosa*; possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Pharmaceutical Biology* 48, 70–75.
- Farkas, S., Berzensky, P., Kárpáti, E., Kocsis, P., Tarnawa, L., 2005. Simple pharmacological test battery to assess efficacy and side effect profile of centrally acting muscle relaxant drugs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 52, 264–273.
- Fernández, S.P., Wasowski, C., Paladini, C.A., Marder, M., 2004. Sedative and sleep-enhancing properties of linear flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 77, 399–404.
- Fernández, S.P., Wasowski, C., Loscalzo, M.L., Granger, E.R., Johnston, G.A.R., Paladini, C.A., Marder, M., 2006. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *European Journal of Pharmacology* 539, 168–176.
- Fernández, S.P., Nguyen, M., Yow, T.T., Chu, C., Johnston, G.A., Hanrahan, J.R., Chebib, M., 2009. The flavonoid glycosides, myricitrin, gossypin and naringin exert anxiolytic action in mice. *Neurochemical Research* 34, 1867–1875.
- File, S.E., Pellow, S., 1985. Intrinsic actions of the benzodiazepine receptor antagonist, Ro 15-1788. *Psychopharmacology* 88, 1–11.
- Gu, H.F., Chen, R.Y., Sun, Y.H., Liu, F., 2004. Studies on chemical constituents from herb of *Dracocephalum moldavica*. *China Journal of Chinese Materia Medica* 29, 232–234.
- Gylys, J., Mody, I., 2007. Activation of GABA<sub>A</sub> receptors: views from outside the synaptic cleft. *Neuron* 56, 763–770.
- Holm, Y., Galambosi, B., Hiltunen, R., 1988. Variation of the main terpenes in dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) during growth. *Flavour and Fragrance Journal* 3, 113–115.
- Jäger, A.K., Saaby, L., 2011. Flavonoids and the CNS. *Mole* 16, 1471–1485.
- Kahnberg, P., Large, E., Rosenberg, C., Schougaard, J., Camet, L., Sterner, O., Østergaard Nielsen, E., Nielsen, M., Liljefer, T., 2002. Refinement and evaluation of a pharmacophore model for flavone derivatives binding to the benzodiazepine site of the GABA<sub>A</sub> receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* 45, 4188–4201.
- Kakasy, A.Z., Lemberkovic, E., Kursiniszi, L., Janicsak, G., Szoke, E., 2002. Data to the phytochemical evaluation of moldavica dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L., Lamiaceae). *Herba Polonica* 48, 112–119.
- Linares, E., Bye, R., Flores, B., 1999. Plantas Medicinales de México, usos y remedios tradicionales. Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM, México, México, D.F.
- Lorke, D., 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology* 54, 275–287.
- López-Rubalcava, C., Hen, R., Cruz, S.L., 2000. Anxiolytic-like actions of toluene in the burying behavior and plus-maze tests: differences in sensitivity between 5-HT<sub>1B</sub> knockout and wild-type mice. *Behavioral Brain Research* 115, 85–94.
- López-Rubalcava, C., Piña-Medina, B., Estrada-Reyes, R., Heinze, G., Martínez-Vázquez, M., 2006. Anxiolytic actions of the hexane extract from leaves of *Ammonia chermolia* in two paradigms: possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Science* 78, 730–737.
- Murakami, T., Yamane, H., Tomonaga, S., Furuse, M., 2009. Forced swimming and imipramine modify plasma and brain amino acid concentrations in mice. *European Journal of Pharmacology* 602, 73–77.
- Naghbi, F., Mosaddegh, M., Mohammadi, M.S., Ghorbani, A., 2005. Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2, 63–79.
- Najafi, M., Ghasemian, E., Fathiazad, F., Garjani, A., 2009. Effects of total extract of *Dracocephalum moldavica* on ischemia/reperfusion induced arrhythmias and infarct size in the isolated rat heart. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 11, 229–235.
- Nagatani, T., Sugihara, T., Kodaira, R., 1984. The effect of diazepam and of agents which change gabaergic functions in immobility in mice. *European Journal of Pharmacology* 97, 271–275.
- Petit-Demoulière, B., Chenu, F., Bourin, M., 2005. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology* 177, 245–255.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977a. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730–732.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M., 1977b. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 229, 327–336.
- Redrobe, J.P., Bourin, M., Colomel, M.C., Baker, G.B., 1998. Psychopharmacological profile of the selective serotonin reuptake inhibitor, paroxetine: implication of noradrenergic and serotonergic mechanisms. *Journal of Psychopharmacology* 12, 342–355.

(4 mg/kg); in this case, diazepam also decreased both the number of transitions between the black and dark compartments in the AEBT and reduced general activity in the open field test.

On the other hand, the hole-board offers a simple method for measuring the response of an animal to an unfamiliar environment, with the advantages that several behaviors can be readily observed and quantified. For example, Takeda indicated that head-dipping behavior was sensitive to changes in the emotional state of the animal, and suggested that the expression of an anxiolytic state in animals might be reflected by an increase in head-dipping behavior (Takeda et al., 1998). On the other hand, a decrease in the number head-dipping and the number rearing relative to controls reveals a depressant behavior (File and Pellow, 1985; Viola et al., 1995). Our results showed that DM produced a statistically significant decrease in a dose dependent fashion (Fig. 1) of all behavioral patterns measured in the hole-board test, an action which is considered as a sedative effect. Also, as previously mentioned these sedative effects were confirmed in the OFT since DM significantly decreased mice general activity.

The Rota-rod test is a paradigm proposed to denote motor coordination or muscle relaxant effect. DM-treated animals showed a decrease in the time that mice were able to maintain on the Rota-rod. These results indicate that DM also reduced motor coordination at the dose tested, similar to the effect induced by high doses of DZ. Muscle weakness, decrease of ambulatory activity and sedation are usually manifestations produced by some benzodiazepines as diazepam, an anxiolytic-sedative drug of clinical use, which also impaired the performance of rodents in the Rota-rod (López-Rubalcava et al., 2000; Farkas et al., 2005; Estrada-Reyes et al., 2010). Overall, it can be concluded that rather than inducing anxiolytic-like actions, DM induced sedative effects that affected mice general activity and motor coordination.

Further evidence of the central sedative activity of DM is provided by the extract ability to enhance the sleeping time induced by SP. It is also well known that neurodepressant barbiturates such as SP bind to the barbiturates site on the GABA<sub>A</sub> receptor complex, where it can potentiate GABA-mediated hyperpolarization of post-synaptic neurons. Furthermore, when we administered a sub-threshold dose of SP (not sufficient to induce sleep by itself) in combination with DM, both compounds induced sleep in the experimental animals. For example the combination of 30 mg/kg of SP and 200 mg/kg dose of DM produce a similar effect to that produced by the same dose of SP in combination with 1 mg/kg dose of DZ. These results showed that there is a relationship between the capacities of SP to induce sedation and the sedative effects produced by DM. It is therefore possible that the GABAergic system participates in the DM-induced enhancement of the effects of SP.

The forced swimming test (Porsolt et al., 1977a) is a useful model, relative quick and simple to perform and reliable across laboratories, to predict its antidepressant and mood states (Borsini and Meli, 1988; Redrobe et al., 1998) in rodents. In this test, the pre-test induce in the mice an acute stress reflex, which is observed as an immobility behavior, this behavior is reversed by antidepressant such as IMI and CMI, in the test period (Petit-Demouliere et al., 2005). Our results shows that i.p. administration of a single dose of DM induced a statistically significant increased in the immobility time, in an opposite way to the effect induced by IMI and CMI, two tricyclic antidepressants of clinical use. As mentioned earlier, a significant reduction in the immobility time is considered as an antidepressant-like effect in this test. Therefore, it can be concluded that DM has no antidepressant-like actions. The increase in the immobility time observed after DM administration could be a consequence of unspecific actions on mice general activity and motor coordination. However, the lacking of antidepressant-like effects could give a track about the possible mechanism through which DM exerts its sedative actions. In this sense, it is well known that

the majority of drugs that increase GABAergic transmission produce sedation and drowsiness and have no antidepressant effects neither in animals nor in human beings (Nagatani et al., 1984; Briones-Aranda et al., 2005). However, future studies are necessary to further confirm this hypothesis.

The wide spread distribution of GABA, coupled with the fact that virtually all neurons are sensitive to its inhibitory effect, indicates that GABA function is ubiquitous in the brain. Studies have also shown that GABA is a transmitter in about 30% of all the synapses in the CNS (Gykys and Mody, 2007). Thus, it is not surprising to think, that the CNS depressant actions observed with DM administration could be through this important central inhibition system. In agreement with this observation, it is well known that many extracts and plants rich in glycoside and aglycone flavonoids, possess sedative, anxiolytic, and antiepileptic properties mediated through their affinity (*in vitro*) with benzodiazepine site of GABAergic complex system or are direct or indirect modulators of this receptor (Kahnberg et al., 2002; Fernández et al., 2004, 2006, 2009; Awad et al., 2009; Estrada-Reyes et al., 2010). Thus the presence of several flavonoids in DM, particularly flavone glycosides, could account for the depressant and sedative effects on the CNS. Further studies that examine this mechanism of action are currently in progress in our laboratory.

Regarding the chemical composition of DM, the spectrophotometric analysis showed that the total content of flavonoids in the aqueous extract is 16.6% of abundance, with respect to quercetin. Additionally, DM tested positive for polyphenols, tannins, glycosides, sterols, and was not found to contain alkaloids-type compounds (data no shown).

There are several reports about the presence, sometimes quantitative important, of rosmarinic acid in aqueous and methanol extracts of *Dracocephalum moldavica* and it is known that rosmarinic acid produce anxiolytic-like effects in mice tested in the FST (Takeda et al., 2002). Taking it into account, we performed a HPLC-ESI-MS scanner and spectrophotometric methods, directed to detect rosmarinic acid (Christ and Kesselring, 1982; Wang et al., 2004; Wen et al., 2005; Sánchez-Campillo et al., 2009), however the result was negative. This information turns out to be interesting, due to the fact that it is well-known that rosmarinic acid beside with apigenin flavone are the responsible of the anti-anxiety effects of Russian and Asian species and the absence this metabolites could be explain the lacking of anxiolytic effect of the Mexican specie of *Dracocephalum moldavica* (Budantsev and Shavarda, 1994; Zanolli et al., 2000; Gu et al., 2004; Naghibi et al., 2005; Dastmalchi et al., 2007).

According to the data of HPLC-ESI-MS analyses about DM, the main components are the acacetin 7-O-β-D-(6''-O-malonyl)-glucoside (9), luteolin 7-O-β-D-(6''-O-malonyl)-glucoside (4), and apigenin 7-O-β-D-(6''-O-malonyl)-glucoside (6), and acacetin 7-O-β-D-glucuronide (8), while acacetin (11), 8-hydroxy salvigenin (16) and diosmetin(12) aglycones are present in trace amounts. Finally, maltose, xylose, glucose and fructose sugars and ferulic acid were also detected in the aqueous extract of *Dracocephalum moldavica* (Kakasy et al., 2002; Kakasy, 2006). In regarding to the chemical study of *Dracocephalum moldavica*, the composition of oils essential was similar to the reported for the Asian and Russian *Dracocephalum moldavica* species, while that the principal difference was the absence of rosmarinic acid and the low concentration of apigenin as well as abundant quantity of sugars detected in the Mexican specie. Being also important the variety of flavonoid glycosides derivatives found in the studied species. It has been reported that some flavonoids glycosides in *in vivo* models, showed effects on the CNS. For example the flavonoid glycosides linarin, 2S-hesperidin, 2S-neohesperidin, 2S-naringenin, diosmin, gossypin and rutin were found to exert a depressant action on the CNS of mice following i.p. injection, measured in the hole

## Author's personal copy

M. Martínez-Vázquez et al. / Journal of Ethnopharmacology 141 (2012) 908–917

917

- Sánchez-Campillo, M., Gabaldon, J.A., Castillo, J., Benavente-García, O., Del Baño, M.J., Alcaraz, M., Vicente, V., Alvarez, N., Lozano, J.A., 2009. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV other ionizing radiations. *Food and Chemistry Toxicology* 47, 386–392.
- Schürmann da Silva, A.F., de Andrade, J.P., Bevilacqua, L.R.M., de Souza, M.M., Izquierdo, I., Heriques, A.T., Zuanazzi, J.A.S., 2006. Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 85, 148–154.
- Sousa, F.C., Melo, C.T., Monteiro, A.P., Lima, V.T., Gutierrez, S.J., Pereira, B.A., Barbosa-Filho, J.M., Vasconcelos, S.M., Fonteles, M.F., Viana, G.S., 2004. Antianxiety and antidepressant effects of riparian III from Anib riparia (Nees) Mez (laureaceae) in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 78, 27–33.
- Sultan, A., Bahang, H.A., Aisa, A., Eshbakova, K.A., 2008. Flavonoids from *Dracopcephalum moklavica*. *Chemistry of Natural Compounds* 44, 366–367.
- Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T., 1998. Changes in head-dipping behavior in hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *European Journal of Pharmacology* 350, 21–29.
- Takeda, H., Tsuji, M., Inazu, M., Egashira, T., Matsumiya, T., 2002. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *European Journal of Pharmacology* 449, 261–267.
- Tingli, L., Guanghui, X., Wu, L., Chunyu, S., 2007. Pharmacological studies on the sedative and hypnotic effect of salindroside from the Chinese medicinal plant *Rhodiola sachalinensis*. *Phytomedicine* 14, 601–604.
- Viola, H., Wasowski, C., Levi de Stein, M., Wolfman, C., Silveira, R., Dajas, F., Medina, J.H., Paladini, A.C., 1995. Apigenin, a component of *Matricaria reticulata* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Medica* 61, 213–216.
- Wang, H., Prova, J.G., Helliwell, K., 2004. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chemistry Analytical Nutritional and Clinical Methods* 87, 307–311.
- Wen, D., Li, C., Di Hao Liao, Y., Liu, H., 2005. A universal HPLC method for the determination of phenolic acids in compound herbal medicines. *Agricultural and Food Chemistry* 53, 6624–6629.
- Wu, W., Liu, Z., Song, F., Liu, S., 2004. Structural analysis of selected characteristic flavones by electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Sciences* 20, 1103–1105.
- Xu, Y., Ku, B.-S., Yao, H.-Y., Lin, Y.-H., Ma, X., Zhanf, Y.-H., Li, X.-J., 2005. The effects of curcumin on depressive-like behavior in mice. *European Journal of Pharmacology* 518, 40–46.
- Zanoli, P., Avallone, R., Baraldi, M., 2000. Behavioral characterization of the flavonoids apigenin and chrisin. *Fitoterapia* 71, 117–123.



# Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central

Rosa Estrada-Reyes,<sup>1</sup> Denisse Ubaldo-Suárez,<sup>1</sup> Ana Gabriela Araujo-Escalona<sup>1</sup>

Artículo original

## SUMMARY

The aim of the present study was to show the most relevant aspects of the flavonoids such as their origin, sources, chemical structures, and metabolism in the body human. We offer a brief review about their antiallergic, anti-cancer, anti-inflammatory, and analgesic properties. This review shows their effects on CNS and evidences their pharmacologic potential in the therapeutics of the mental disorders.

Flavonoids may have existed in nature for over 1 billion years and thus have interacted with evolving organisms. These compounds are molecules of low molecular mass, abundant in all berries and citric fruits, chocolate, nuts, red wine, and several medicinal plants. Flavonoids interact with several enzymes responsible for the transport of xenobiotics to the brain, which are considering modifiers of the biological response. Perhaps the most studied have been their anti-oxidant properties, which have met reflected in his capacity to protect to the cells of the oxidative stress, implicated several pathologies associated with aging, such as Alzheimer's and Parkinson's diseases.

In the last 30 years, a intensive research about the effects of the flavonoids on CNS has been carried out; in this regard, flavonoids have showed effective effects as anxiolytic, antidepressants, and anticonvulsive drugs, and although their actions in the CNS occur through a variety of interactions with different receptors and signaling pathways, it has been demonstrated that these effects are mediated principally by GABA, in particular GABA<sub>A</sub> receptors, which these has led them to being postulates as a new benzodiazepines family, but without the side effects of these.

**Key words:** Flavonoids, CNS, GABAergic receptors, anxiety, depression, oxidative stress.

## RESUMEN

El propósito de esta revisión fue describir los aspectos más relevantes de los flavonoides como su origen, sus fuentes y metabolismo, sus propiedades farmacológicas como antialérgicos, anticancerosos, anti-inflamatorios, analgésicos. También revisamos sus efectos sobre el SNC poniendo en evidencia su potencial farmacológico en la terapéutica de los trastornos mentales.

Los flavonoides son sustancias de bajo peso molecular que han estado presentes en la naturaleza durante millones de años. El hombre los consume en la dieta ya que están presentes de forma abundante en los vegetales, las frutas rojas como las fresas, zarzamoras, frutas cítricas, el chocolate, las nueces, el vino tinto y en varias plantas medicinales. Estos compuestos poseen una amplia gama de actividades farmacológicas entre las que destacan sus propiedades anti-oxidantes, las cuales les confieren capacidad de proteger a las células del estrés oxidativo relacionado con patologías asociadas al envejecimiento, como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson.

En los últimos 30 años se ha realizado una intensa investigación sobre sus acciones en el SNC, entre las que sobresalen sus propiedades como ansiolíticos, sedantes, antidepressivos y anticonvulsivos. Se ha demostrado que estos efectos son mediados principalmente por los receptores GABA, en particular los receptores GABA<sub>A</sub>, por lo que los flavonoides han sido reconocidos como una nueva familia de benzodiazepinas, con la ventaja de no presentar los efectos colaterales que éstas producen.

**Palabras clave:** Flavonoides, SNC, receptores GABAérgicos, ansiedad, depresión, estrés oxidativo.

## ¿QUÉ SON LOS FLAVONOIDES?

Los flavonoides son sustancias de bajo peso molecular producidas por casi todas las plantas vasculares. Esta gran familia de compuestos ha estado presente en la naturaleza durante más de mil millones de años, de manera que han actuado recíprocamente con el desarrollo de muchos organismos. Los flavonoides cumplen un importante papel

en la naturaleza que ha perdurado en las plantas vasculares a lo largo de la evolución. Esta asociación entre las plantas productoras de flavonoides y las diversas especies animales y otros organismos, puede explicar la gama extraordinaria de actividades bioquímicas y farmacológicas que estos productos ejercen en el hombre y otros mamíferos, como resultado de la coexistencia o coevolución de ambos reinos.

<sup>1</sup> Laboratorio de Fitofarmacología, Dirección de Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

Correspondencia: MS. Rosa Estrada-Reyes. Laboratorio de Fitofarmacología, Dirección de Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. Calz. México-Xochimilco 101. San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, 14370 Mexico, DF. Tel: (52) (55) 4160-5080. Fax: (52) (55) 5655-9980. E-mail: restrada@imp.edu.mx

En las plantas, algunos flavonoides confieren resistencia contra la fotooxidación de la luz ultravioleta del sol, intervienen en el transporte de hormonas y algunos funcionan como defensa ante los depredadores. Desde el siglo pasado es bien conocida la relación que existe entre la presencia de flavonoides en las plantas y su resistencia a las infecciones fúngicas y virales. Otra de sus importantes funciones en muchas plantas es la atracción de los insectos polinizadores por medio del color o del olor que les confieren a éstas o a sus flores asegurando así su reproducción y conservación.<sup>1,2</sup>

El hombre los consume cotidianamente en la dieta ya que están presentes de forma abundante en los vegetales, las frutas rojas como las moras, fresas, zarzamoras (*Vaccinium ssp.*); frutas cítricas (*Citrus ssp.*), el chocolate (*Theobroma cacao*), las nueces, las bebidas derivadas de la uva (*Vitis vinifera*) como el vino tinto, los té verde y negro (*Camelia sinensis*), así como en otros alimentos. También están presentes en plantas medicinales aromáticas pertenecientes a la familia Lamiaceae.

## METABOLISMO DE LOS FLAVONOIDES

Se calcula que la ingesta diaria de flavonoides contenidos en la dieta es de uno a dos gramos por día, dependiendo principalmente de los hábitos dietéticos. En México no existe información acerca de las cantidades que se consumen.<sup>3</sup>

La mayor parte de los flavonoides (a excepción de las catequinas) está presente en las plantas y alimentos en forma de  $\beta$ -glicósidos. Aunque la más frecuente de las unidades de glicosidación es la glucosa también están presentes la glucoramina, la galactosa, la arabinosa y la ramnosa. Una vez que son ingeridos y antes de entrar a la circulación general, estos glicósidos pueden sufrir deglicosilación (hidrólisis) de la siguiente forma: debido a que la unión  $\beta$  de estos azúcares resiste la hidrólisis de las enzimas pancreáticas, este proceso se lleva a cabo predominantemente en el lumen intestinal por la acción de dos enzimas: 1. la lactasa phloridzina hidrolasa (LPH), que se encuentra en la membrana de los enterocitos (cuando los flavonoides son hidrolizados por esta enzima atraviesan por difusión pasiva la membrana intestinal) y 2. la enzima  $\beta$ -glucocidasa citosólica no específica (CBG), que es capaz de hidrolizar una amplia gama de glicósidos incluyendo glucósidos, galactósidos, xilósidos, arabinósidos y fructósidos.<sup>4,5</sup> Esta enzima está localizada intracelularmente en los enterocitos, por lo que se requiere del transporte activo de los glicósidos por medio del transportador de azúcar SGLT-1 dependiente de sodio.<sup>4</sup>

Por otra parte, los glicósidos que no son sustratos para la LPH o para el SGLT-1 son transportados hacia el colon donde son hidrolizados por las bacterias allí presentes.<sup>7</sup>

Los flavonoides una vez hidrolizados (agliconas) se conjugan por metilación, sulfatación o glucuronidación principalmente y debido a que tienen una capacidad de conjugación alta su concentración en el plasma es por lo general baja.<sup>8</sup> Estu-

dios realizados con ratas mostraron la presencia de metabolitos conjugados en la sangre portal, lo cual apoya que la conjugación se inicia en los enterocitos antes que en el hígado.<sup>9,10</sup>

Aunque numerosos estudios han descrito los efectos de diversos flavonoides en el SNC, es escasa la información de cómo permean la barrera hematoencefálica (BHE). Investigaciones recientes *in vitro* e *in vivo* indican que tanto los flavonoides hidrolizados (agliconas) como sus productos de conjugación son capaces de atravesar la BHE.<sup>11</sup> Algunas investigaciones indican que flavonoides glicosidados como el 3- $\beta$ -rutinosido de cianidina y el glucósido de pelargonina, así como las flavanonas (agliconas) hesperetina, naringenina y sus productos de conjugación atraviesan la BHE.<sup>12-14</sup> Por lo que, al parecer, la capacidad de los flavonoides de permear la BHE no sólo depende de su lipofiliidad sino también de su capacidad de conjugación; metabolitos que son conjugados por metilación en el intestino delgado y en el hígado, al ser más lipofílicos, pueden permear la BHE con mayor facilidad que sus agliconas de origen. Por la misma razón se pensaría que los metabolitos más polares, por ejemplo los resultantes de conjugación por glucuronidación o los glicosilados, no podrían permear la BHE; existen investigaciones que sugieren que *in vivo* esta clase de glicósidos la atraviesan cuando se unen a transportadores específicos dependientes de ATP como la glicoproteína P (P-gp) expresada en la BHE. La P-gp pertenece al grupo de transportadores ABC (*ATP-binding-casette*) y están encargados de transportar compuestos estructuralmente diferentes así como sus derivados conjugados, además de regular la salida ("efflux") de estos compuestos de una manera activa y dependiente de ATP.<sup>14,15</sup> Estudios recientes muestran que algunos flavonoides no sólo son transportados por la P-gp sino que interactúan con ésta moderando su actividad, por lo que los flavonoides han sido descritos como "modificadores de la respuesta biológica" por su capacidad de modular la reacción del cuerpo ante xenobióticos.<sup>9,16,17</sup>

## CLASIFICACIÓN DE LOS FLAVONOIDES

De forma coloquial se tiende a generalizar cuando se habla de "los flavonoides" y sus beneficios en la salud, sin embargo esta familia se caracteriza por su diversidad estructural de tal manera que se han identificado más de 6000 de estos metabolitos secundarios cuyas propiedades biológicas dependen en gran medida de su estructura particular, es decir del tipo de sustituyentes, grupos funcionales, grado de oxidación, formas diméricas, poliméricas, formas glicosidadas o libres, entre otras. El término flavonoide es generalmente utilizado para describir una amplia gama de productos naturales con un sistema C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (anillos A, C y B) o más específicamente con una funcionalidad fenilbenzopirano, benzo- $\gamma$ -pirano o cromano, consistente en un anillo fenólico y un anillo pirano y son clasificados de acuerdo a sus sustitución (figura 1).

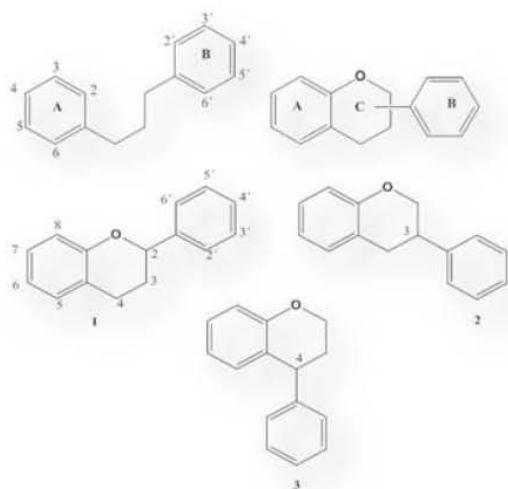


Figura 1

Los flavonoides se dividen inicialmente en tres clases, dependiendo del sitio de unión del anillo B con el benzopirano (A): los flavonoides 1 (2-fenilbenzopiranos), isoflavonoides 2 (3-benzopiranos) y los neoflavonoides 3 (4-benzopiranos). Los flavonoides 1 (2-fenilpiranos), a su vez, dependiendo del grado de oxidación y saturación presente en el heterociclo se dividen en los siguientes grupos: Los isoflavonoides (3-benzopiranos 2) son una clase distintiva de flavonoides, estos compuestos poseen un esqueleto, 3-fenilcromano que es derivado biogénicamente de una migración 1,2-aril del precursor 2-fenilcromano. A pesar de su limitada distribución en el reino vegetal, los isoflavonoides son notablemente diversos en cuanto a sus variaciones estructurales, no sólo en el número y complejidad de los sustituyentes sobre el sistema básico, también en los diferentes niveles de oxidación y en la presencia de un heterociclo adicional (figura 2). Es así que los isoflavonoides se dividen en los siguientes grupos:

a) Los neoflavonoides (4-benzopiranos 3) que están estructural y biogénicamente relacionados con los flavonoides, y b) los isoflavonoides, conformados por las 4-aril-coumarinas (4-aril-2H-1-benzopirano-2-onas), las 3,4-dihidro-4-arilcoumarinas y el neoflavano.

### EFFECTOS FARMACOLÓGICOS DE LOS FLAVONOIDES

Esta variedad estructural está relacionada con las diversas actividades biológicas que poseen los flavonoides, de entre las cuales destaca, tal vez por ser una de las más estudiadas, sus propiedades antiinflamatorias. Desde 1948 se describie-

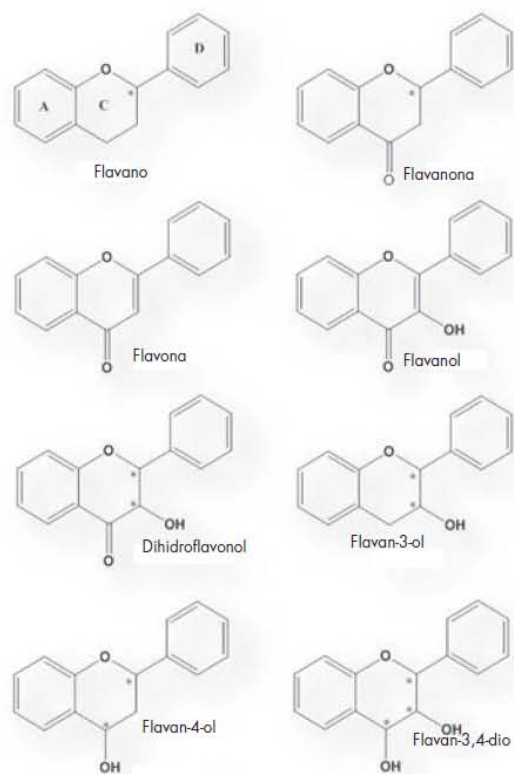


Figura 2

ron las propiedades antiinflamatorias de la hesperidina, la naringenina y la nobiletina, presentes en la fracción soluble en agua de casi todas las especies de *Citrus*; a partir de entonces son muchos los estudios *in vivo* e *in vitro* que describen las propiedades antiinflamatorias de los flavonoides y sus mecanismos.<sup>18</sup>

Además de sus propiedades antiinflamatorias se ha descrito una variedad de efectos producidos por estos metabolitos. En el cuadro 1 se describen los más documentados, sin mencionar sus efectos sobre el SNC, los cuales se abordarán a continuación.

### EFFECTOS DE LOS FLAVONOIDES SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Históricamente las acciones biológicas de los flavonoides se han atribuido a sus propiedades antioxidantes; debidas principalmente al potencial quelante que les confiere su estructura química, de tal manera que la actividad antioxidante puede deberse a sus capacidades reductoras *per se* o



**Cuadro 1.** Efectos farmacológicos de algunos flavonoides

Efectos	Flavonoide	Referencias
Antineoplásico	quercetina, kaemferol, fisetina	19,21
Cardiotónicos	3-metil-quercetina	22,23
Disminuyen la fragilidad capilar	rutina, quercetina, naringenina	19,24
Antitrombóticas	tangeretina, hesperidina, rutina	23,25
Disminución del colesterol	liquiritigenina	26
Protección y regeneración hepática	silimarina, apigenina	24,27,28
Antiulcéricos	Kaemferol, quercetina	29,30
Antimicrobianos	quercetina, baicalina	
Antibacterial	crisina, rutina	31,32
Antiviral	crisoeriol	33,34
Antifúngica	cloroflavonina, apigenina	
Antiinflamatorios	hesperidina, luteolina, quercetina	35,36
Analgésico	hesperidina	37,38
Anticancerígeno	quercetina	20,39,40

por influenciar el estado de oxidación/reducción (*redox*) intracelular. Este potencial antioxidante ha sido asociado con la reducción del riesgo de ciertas enfermedades crónicas, la prevención de algunas enfermedades cardiovasculares y de algunas clases de cáncer. Sin embargo, también se ha especulado que su clásica actividad antioxidante donadora de hidrógenos no puede explicar la bioactividad de los flavonoides en los sistemas vivos.

El estado de *redox* de la célula es el equilibrio entre los niveles fijos de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) con los sistemas celulares antioxidantes. Un indicador clave en este balance es la relación entre el sistema enzimático glutatión reducido (GSH) y el glutatión oxidado (GSSG), o mejor dicho el potencial *redox* de GSH. La reserva celular de GSH/GSSG es un sistema dinámico que lleva a cabo reacciones de oxidación y reducción con ERO y ERN, en sistemas antioxidantes y grupos tioles de algunas proteínas. Al parecer las células se hacen más oxidadas durante la progresión del ciclo de vida a partir del estado de proliferación (-230 a 260mV) hacia el ciclo de arresto y diferenciación (-200mV), hasta la apoptosis de la célula (-150mV). Considerando en conjunto estos datos el estrés oxidativo/nitrosativo es el cambio del estado de *redox* de una célula hacia la oxidación que causa daño a las funciones celulares y a las biomoléculas esenciales.

Es en este contexto en el que los efectos antioxidantes de algunos flavonoides pueden ser importantes para ayudar a recuperar la homeostasis de óxido-reducción en las patologías degenerativas y los trastornos asociados al envejecimiento, como la enfermedad de Alzheimer, la demencia senil y las fallas en los procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje, que se caracterizan por presentar un alto estrés oxidativo celular. De estas investigaciones destacan las rea-

lizadas por Matsuzaki et al. (2006),<sup>41</sup> quienes han descrito la participación de la nobiletina en los mecanismos relacionados con la memoria y el aprendizaje. En este estudio demostraron que la nobiletina posee un mecanismo único de acción neurotrófica, es decir favorece el desarrollo, crecimiento y funcionamiento neuronal, revirtió la pérdida de memoria inducida por la proteína  $\beta$ -amiloide y mejoró la memoria olfativa de ratas bulbectomizadas. Esto se logró gracias a que interactúa selectivamente con dos proteínas cinasas: la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (la cual está asociada al crecimiento celular) y por la proteína fijadora del elemento de reconocimiento del AMPc (CREB) (una proteína de transcripción génica) cuya activación favorece el crecimiento de nuevas conexiones sinápticas proporcionando un estado estable de la memoria a largo plazo.<sup>42</sup> En 2007 este mismo equipo de investigación mostró que la nobiletina interactúa con el sistema glutamatérgico, en particular con los receptores AMPA, para ejercer sus efectos sobre la memoria.<sup>43,44</sup>

Curiosamente la historia del descubrimiento de los efectos de los flavonoides sobre el Sistema Nervioso Central está ligada al descubrimiento de los receptores del ácido gama amino butírico (GABA), que condujo a la caracterización de dichos receptores y a una incesante búsqueda de las sustancias cerebrales endógenas que se unen a este receptor. Como parte de esta búsqueda se investigó también la presencia de moléculas afines a los receptores a GABA en alimentos de origen animal y vegetal, así como en plantas utilizadas en la etnomedicina de todo el mundo.<sup>45</sup>

Por otro lado, a partir de los años 1960 los fármacos ansiolíticos más utilizados en la práctica clínica han sido los de la familia de las benzodiazepinas (BDZ), utilizados también para el tratamiento de la epilepsia, el insomnio, ciertos estados depresivos, algunos estados afectivos, etcétera. Las benzodiazepinas ejercen su acción por su interacción con los receptores GABAérgicos tipo A. Estos receptores son proteínas transmembranales con un ensamble hetero-oligomérico ya que están constituidas por varias subunidades, que conforman un canal iónico permeable al ion cloruro (Cl<sup>-</sup>) y cuyo ligando es el ácido gama amino butírico (GABA). Cuando el GABA se une al receptor el canal iónico se abre permitiendo el flujo del ion cloruro el cual produce la hiperpolarización de la membrana de la neurona receptora y la inhibición de la transmisión de los impulsos nerviosos, produciendo efectos tranquilizantes, sedantes o ansiolíticos.

Estos efectos son atribuidos a la interacción selectiva de las subunidades que conforman al receptor con distintos ligandos que pueden hacer más eficiente la transmisión GABAérgica. En el SNC de los vertebrados se han identificado diferentes subunidades de los receptores GABA<sub>A</sub> como  $\alpha 1$ - $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ - $\beta 3$  (más  $\beta 4$  en el cerebro del pollo),  $\gamma 1$ - $\gamma 3$  (más  $\gamma 4$  en el cerebro del pollo),  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\rho 1$ - $\rho 3$ .<sup>46,47</sup>

Además de los receptores GABA<sub>A</sub>, el GABA activa a otros dos tipos de receptores: el GABA<sub>B</sub> que es conocido por estar acoplado a canales de Ca<sup>2+</sup> o K<sup>+</sup>, los cuales activan

sistemas de segundos mensajeros en la célula vía proteínas G; y los receptores GABA<sub>C</sub>, un subgrupo de los receptores GABA<sub>A</sub> en el cual predomina la subunidad  $\rho$  y están directamente asociados con los canales de cloruro.

El receptor GABA tiene un sitio de unión a las BDZ que está localizado en la interfase de la subunidad  $\alpha$  y la subunidad  $\gamma$ , en los receptores GABA<sub>A</sub>. Las BDZ actúan aumentando la corriente de cloruro inducida por GABA. La presencia de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\gamma 2$  es un requisito indispensable para que la unión funcional de BDZ sea completa y la modulación de la corriente de cloruro sea óptima. La diversidad de ligandos GABA/BDZ, la cual resulta de la existencia de las subunidades, ha sido implicada en las múltiples propiedades farmacológicas producidas por ligandos con escasa selectividad subtipo como el diazepam. Más aún, la heterogeneidad regional del complejo GABA/BDZ se ha sugerido como otra razón para la multiplicidad de propiedades farmacológicas de los ligandos a BDZ.

En 1983, el grupo argentino de Medina, Paladini y colaboradores realizaron investigaciones buscando los principios activos de plantas con propiedades sedantes. Realizaron estudios de unión a receptores a BDZ con la esperanza de encontrar principios activos con estructuras similares a las benzodiazepinas. Como resultado de este estudio aislaron y demostraron por primera vez que la flavona crisina y la apigenina aisladas de la pasiflora (*Passiflora coerulea*), de la manzanilla (*matricaria rucutita*) y el núcleo flavona en sí mismo, poseen propiedades ansiolíticas en modelos de conducta en ratones. En modelos in vitro estos metabolitos secundarios mostraron alta y mediana afinidad por el sitio de unión a BDZ. Estas flavonas presentaron además escasa actividad sedante y miorelajante, lo cual representó la primera ventaja de estos metabolitos sobre las BDZ y mostró su potencial como fármacos para uso humano. Siguiendo

la investigación de estos importantes hallazgos, Paladini y colaboradores hicieron modificaciones químicas de las flavonas ansiolíticas naturales y obtuvieron derivados con mejores propiedades, de los cuales la 6,3'-dinitroflavona mostró una afinidad por los receptores cerebrales específicos, comparable a la de las BDZ, pero con una actividad 10 veces superior. También realizaron un estudio análogo al descrito, con las valerianas, plantas de uso milenario en la medicina tradicional por sus propiedades tranquilizantes e inductoras del sueño. Esta investigación permitió descubrir en sus extractos la presencia del flavonoide 6-metilapigenina, que resultó ser un ligando para el receptor GABA<sub>A</sub> con propiedades ansiolíticas pero no sedantes ni hipnóticas, y de los rutinósidos de flavanona hesperidina y linarina, que no tuvieron afinidad por el receptor GABA<sub>A</sub> ni presentaron efectos ansiolíticos. En cambio, ambos rutinósidos resultaron potentes sedantes e hipnóticos (figura 3).<sup>45,48,49</sup>

La asombrosa variedad de interacciones que presentan diversos flavonoides con el receptor tipo A del GABA, condujo a realizar estudios para determinar la interacción selectiva de una variedad de flavonoides naturales y derivados sintéticos con las diferentes isoformas del receptor GABA<sub>A</sub>. Tal es el caso de la 2'-metoxy-6-metilflavona y la trans-(2S,3R)-3-acetoxi-4'-metoxiflavanona. Ambas flavonas incrementaron las corrientes iónicas del canal gracias a su interacción con las subunidades  $\alpha 2\beta 2/3$  y  $\alpha 2\beta 1\gamma 2L$  (expresados en ovocitos de *Xenopus leavis*); mismas subunidades que producen los efectos ansiolíticos y sedantes del diazepam, el loreclezole y la etamida, explicando así los efectos ansiolíticos a dosis bajas y sedantes a dosis altas que posee la 2'-metoxy-6-metilflavona en ratones, mientras que la trans-(2S,3R)-3-acetoxi-4'-metoxiflavanona solamente presentó efectos ansiolíticos debido a su selectividad por la subunidad  $\alpha 2$  de los receptores GABA<sub>A</sub>.

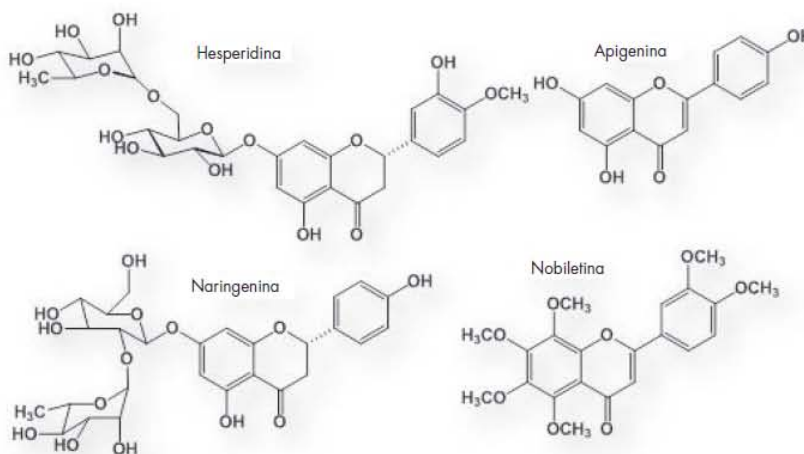


Figura 3



**Cuadro 2.** Efectos de algunos flavonoides sobre el Sistema Nervioso Central

Flavonoide	Ejemplo	Referencia
Ansiolíticos	6-metilapigenina, wogonina, luteolina, 6-bromoflavanona	51-53
Antiepilépticos o anticonvulsivos	rutina, gospipina	54,55
Sedantes o inductores del sueño	hesperidina, spinosina	56,57
Antinociceptivos	miricetrina	58
Mejoran la memoria, el aprendizaje y el funcionamiento cognitivo	rutina, nobiletina, quercetina, linarina	23, 54
Antidepresivos	quercetina, apigenina	59,60
Moduladores de la función neural	nobiletina, hesperidina	61
Anti-neuroinflamatorios	wogonina, luteolina, epicatequina, flavona	62-65
Neuroprotectores	linarina, rutina	66-68

Se ha descrito que la administración oral de la flavona wogonina, aislada de *Scutellaria baicalensis*, una planta utilizada en la medicina tradicional de China, tiene efectos ansiolíticos y previene las convulsiones inducidas por pentilentetrazol y electrochoques en ratones, sin producir efectos sedantes o miorelajantes. Además se demostró su interacción con el receptor GABA<sub>A</sub> cuando sus efectos fueron bloqueados mediante su coadministración con el antagonista GABAérgico flumazenil.

La amentoflavona es una flavona dimérica cuya actividad ansiolítica ha sido extensamente explorada, ésta fue inicialmente identificada como un ligando de alta afinidad al sitio de BDZs de los receptores GABAérgicos. En estudios subsecuentes se demostró que la amentoflavona posee una actividad bifásica actuando como antagonista a concentraciones nanomolares y, a concentraciones altas (μmolares), como modulador alostérico negativo de GABA en el sitio  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ ; insensible al flumazenil. Una extensa batería de ensayos *in vivo* realizados con medio ligandos han mostrado que la amentoflavona inhibe significativamente la unión de serotonina, dopamina,  $\delta$ -opioides, mientras que no tiene efecto sobre la unión de GABA al sitio de unión del receptor GABA<sub>A</sub>.<sup>50</sup>

Un ejemplo interesante de esto es que la 6-hidroxiflavanona presentó efectos ansiolíticos al ser evaluada en modelos de conducta en ratones. Esta flavanona no presentó los efectos indeseables que producen las BDZs como la sedación, el deterioro cognitivo, la miorelajación y la falta de coordinación motriz. En estudios recientes realizados con receptores GABA expresados en células HEK 293T, se demostró que la 6-hidroxiflavanona es un modulador alostérico parcial positivo, selectivo al sitio de unión a BDZs

sensible al flumazenil, con afinidad significativa por las subunidades  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ .

Otro ejemplo de interacción con el sistema GABAérgico es la flavona hespidulina que posee efectos ansiolíticos y anticonvulsivos en roedores. En estudios realizados con receptores recombinantes expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*, la hespidulina mostró una actividad bifásica: a concentraciones bajas (0.8-5μM) mostró un efecto modulador positivo en las subunidades receptores  $\alpha_1,2,3,5,6\beta_2\gamma_{2S}$ , por medio del incremento del flujo de corriente en estas subunidades, mientras que a concentraciones mayores (>30mM) mostró un efecto contrario sobre estas mismas subunidades. Además la actividad de hespidulina fue parcialmente bloqueada por el flumazenil y fue inactiva sobre los receptores  $\alpha_1\beta_2$ . La acción bifásica y el hecho de que la hespidulina mostró afinidad por los receptores GABAérgicos que contenían la subunidad  $\alpha_6$ , indicaron que ésta interactúa con más de un sitio de unión en estos receptores.

Los ejemplos antes mencionados hacen evidente que las acciones de los flavonoides sobre los receptores GABAérgicos son más complejas que una simple acción sobre el sitio de acoplamiento de las BDZs de estos receptores.

En el cuadro 2 se mencionan los efectos más documentados de los flavonoides sobre el SNC.

### MODELO FARMACÓFORO DE LOS FLAVONOIDES (INTERACCIÓN FLAVONOIDE-RECEPTOR GABA<sub>A</sub>)

Después de los hallazgos de Paladini et al. en los años 1980, quienes observaron una similitud estructural, de afinidad y de respuesta farmacológica entre las BDZs y los flavonoides, se han publicado más de 6000 artículos científicos de estudios *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*, para caracterizar los efectos farmacológicos de los flavonoides naturales y los sintéticos, así como estudios teóricos computacionales *ab initio* y semiempíricos para establecer un modelo de las interacciones ligando-receptor (flavonoide-receptor GABA<sub>A</sub>) con el fin de correlacionar las características estructurales y fisicoquímicas de estos compuestos con su afinidad por los diferentes sitios del receptor y sus consecuentes respuestas conductuales y farmacológicas. De estos estudios destacan la creación de un modelo farmacóforo que describe los requerimientos mínimos necesarios que deben poseer las flavonas para una unión específica y eficiente con el sitio flavona (FS) (que es el mismo que para las BDZs) del receptor GABA. Como se representa en la figura 4, en este modelo el grupo carbonilo de las flavonas interactúa sólo con el sitio bifuncional H2/A3 y el anillo B se coloca cerca de la región lipofílica L2. El anillo A en las flavonas se superpone al anillo 5-fenil del diazepam; no hay interacciones entre las flavonas y el sitio de H1 y no hay posibilidad de interacciones con A2. También en ésta se representan áreas

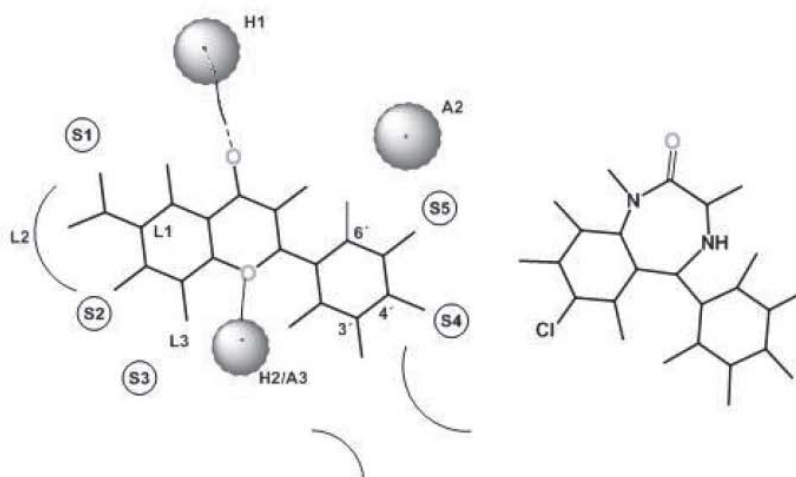


Figura 4. Flavonoide vs diazepam

del receptor de características fisicoquímicas particulares, que son localizadas en un arreglo espacial definido. H1 y A2 son donadores de enlaces de hidrógeno y sitios aceptores, respectivamente, mientras que H2/A3 es un sitio bifuncional donador y aceptor de hidrógeno. L1, L2 y L3 es un *pocket* lipofílico y S1, S2 y S3 son regiones de interacciones estéricas negativas. Los efectos de los sustituyentes en el núcleo flavona en las posiciones 6 y/o 3' muestran que la unión de alta afinidad es relevante y cuantitativa. Este modelo farmacóforo ha servido como base para la síntesis y diseño de una gran variedad de análogos de flavonoides con el propósito de diseñar nuevos fármacos con mejores y más selectivos efectos, y sin los efectos colaterales que aún presentan las BDZs.<sup>69-74</sup> Como resultado de estas intensas investigaciones los flavonoides han sido postulados como "una nueva familia de ligandos con sitios de afinidad específicos en los receptores GABA."

Finalmente podríamos preguntarnos ¿por qué existen sitios de interacción específicos para los flavonoides en el complejo receptor de neurotransmisión de inhibición más importante en nuestro cerebro? ¿Es esto una estrategia evolutiva de la especie humana?

Por otro lado, en 2008 Machado et al. describieron las propiedades tipo antidepressivos de la rutina, un rutinósido de flavanona, en modelos de conducta en ratones y mediante experimentos de co-administración con inhibidores de serotonina y noradrenalina determinaron que los efectos antidepressivos de la rutina fueron debidos a un incremento de la disponibilidad tanto de serotonina como de noradrenalina en la zona sináptica.<sup>75</sup> Después de este estudio se han publicados los efectos antidepressivos de una gran variedad de flavonoides, mostrando así que también interactúan con otros sistemas de neurotransmisión.

### LA INGESTA DESMEDIDA DE FLAVONOIDES PUEDE REPRESENTAR RIESGOS A LA SALUD

Se han tomado como referencia las poblaciones con bajo riesgo como las mediterráneas y los vegetarianos, con un consumo promedio de flavonoides como la quercetina de 68mg, y de 20 a 240mg, respectivamente. El uso de suplementos, particularmente las formulaciones antioxidantes y mezclas herbales que son comúnmente recomendadas en términos de gramos más que de miligramos, puede ser potencialmente tóxico. Por ejemplo, en los suplementos comerciales de quercetina la dosis recomendada está en un intervalo de entre 500 y 1000mg diarios, lo cual es de 10 a 20 veces más que el consumo obtenido en una dieta vegetariana típica. En México la venta de suplementos que contienen flavonoides no está regulada y, en general, en estos productos no se especifica la cantidad ni el tipo de flavonoides que contienen. Un significativo número de estudios proveen evidencia de que algunos flavonoides presentan un papel dual en la mutagénesis y en la carcinogénesis, es decir pueden actuar como antimutagénicos o como promutágenos; como antioxidantes y como pro-oxidantes, lo cual depende en gran medida de los niveles de consumo así como de las condiciones fisiológicas del cuerpo. La exposición a niveles altos de flavonoides, ya sea por medio de la dieta o por consumo de suplementos, puede potencialmente saturar al sistema, propiciando una sobreproducción de especies ERO y produciendo posteriormente daño al DNA y a sus procesos de replicación. Estos efectos pueden ser mayores durante el desarrollo fetal donde el crecimiento celular es rápido, lo cual puede incrementar la sensibilidad a la exposición a diversos flavonoides.<sup>76-78</sup>



A pesar de la inmensa cantidad de información que se ha generado sobre las diversas interacciones de los flavonoides y los seres humanos, es realmente pobre el conocimiento acerca de la toxicidad producida por el exceso en su consumo, mientras que sus atributos benéficos son sobrealvalorados.

Sin embargo, la presencia de éstos como parte de una dieta equilibrada puede a mejorar la salud.

## CONCLUSIONES

Los flavonoides son componentes importantes de la dieta del ser humano y han estado en contacto con éste a lo largo de la evolución. Interactúan de manera directa y/o indirecta con los sistemas esenciales de neurotransmisión cerebral, modulan la actividad de diversas enzimas en las cascadas de señalización de procesos tan importantes como el de la memoria y el aprendizaje, promoviendo un mejor funcionamiento neuronal, por lo que es importante entender cómo influyen en la función cerebral.

El conocer sus características estructurales necesarias para sus efectos sobre los receptores GABA<sub>A</sub> es un desafío clave para el desarrollo de agentes específicos para los receptores subtipo GABA<sub>A</sub> con el fin de lograr la producción de nuevos fármacos más selectivos y con menos efectos colaterales, útiles en la terapéutica de las disfunciones cerebrales y los trastornos mentales.

También resulta atractivo realizar la síntesis de nuevos flavonoides no sólo para producir agentes terapéuticos sino también para el desarrollo de moléculas que puedan ser usadas para investigar el papel de los diferentes sitios de modulación en los receptores GABA<sub>A</sub>.

Finalmente, debemos reiterar que los flavonoides forman o deben formar parte de nuestra dieta diaria; es un hecho que su consumo mejora la salud, por lo que más allá de considerarlos sólo como fármacos para aliviar condiciones patológicas, podemos promover su consumo para prevenir enfermedades.

Si de verdad somos lo que bebemos y comemos, los flavonoides deben considerarse un alimento para el pensamiento ágil y la vida sana.

## REFERENCIAS

1. Tomás-Barberán FA, Wollenweber E. Flavonoid aglycones from the leaf surfaces of some *Labiatae* species. *Plant Syst Evol* 1990;173(3-4):109-118.
2. Harborne JB (editores). *The flavonoids, advances in research since 1986*. Londres: Chapman & Hall; 1994.
3. Manuchair E. *Pharmacodynamic basis of herbal medicine*. USA: CRC Press; 2001.
4. Németh K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 2003;42:29-42.
5. Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA et al. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolyzed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett*. 2000;468:166-170.
6. Berrin JG, McLauchlan WR, Needs P, Williamson G et al. Functional expression of human liver cytosolic beta-glucosidase in *Pichia pastoris*. Insights into its role in the metabolism of dietary glucosides. *Eur J Biochem* 2002;269:249-258.
7. Hollman PC. H. Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Arch Physiol Biochem* 2004;42:74-83.
8. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727-747.
9. Spencer JPE, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES et al. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett* 1999;458:224-230.
10. Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C et al. Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. *J Nutr* 2001;131:2109-2114.
11. De Boer AG, Gaillard PJ. Drug targeting to the brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:323-355.
12. Rang H, Dale M, Ritter J, Moore P. *Pharmacology*. Sexta edición. Edinburgh, UK: ed. Churchill Livingstone; 2007.
13. Wieland HA, Luddens H, Seeburg PH. A single histidine in GABA-A receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J Biol Chem* 1992;267:1426-1429.
14. Bruton R, Qume M. [3H]-GABA binding to GABA-A and GABA-B sites on rat brain crude synaptic membranes. *Methods Mol Biol* 1999;106:27-35.
15. Jäger AK, Saaby L. Flavonoids and the CNS. *Molecules* 2011;16:1471-1485.
16. Álvarez de Felipe AI, Pulido Duarte MM. Transportadores de tipo ABC: consecuencias de su interacción con flavonoides. *BLACPMA* 2008;7(6):296-311.
17. Versantvoort CH, Schuurhuis GJ, Pinedo HM, Bekman CA et al. Genistein modulates the decreased drug accumulation in non-p-glycoprotein mediated multidrug resistant tumor cells-. *Br J Cancer* 1993;68:939-946.
18. Ferraro HK, Namgoong SY, Kim HP. Biological actions of flavonoids. *Arc Pharmacol Res* 1993;16:18-27.
19. Paul P, Ritva J, Ritva S, Mackku H. Dietary flavonoids and risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol* 1997;146:223-230.
20. Felicia VS, Najla GPC, Madeleine M, Keneeth KC. Inhibition of Human Breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr Cancer* 1996;26:167-181.
21. Fritz B, Tobias S, Albrecht K, Chaelotte B et al. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA relegation step of eukaryotic topoisomerase-I. *J Biol Chem* 1996;271:2262-2270.
22. Huesken BCP, Dejong J, Beekman B, Onderwater RCA. Flavonoids as cardio protective agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995;37:55-62.
23. Izzo AA, Dicarlo G, Mascolo N, Capasso F et al. Antiulcer effect of flavonoids. Role of endogenous PAF. *Phytoterapy Res* 1991;8:179-181.
24. Raj KJ, Shalini K. Flavonoids. A review of biological activities. *Indian Drugs* 1999;36:668-678.
25. Nishino C, Enoki N, Tawata S, Mori A et al. Tea flavonoids and microbial disease: A review. *Agric Biol Chem* 1987;51:139-145.
26. Arai Y, Watanabe S, Kimura M. Dietary intake of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin, liquiritigenin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr* 2000;130:2243-2250.
27. Ruick. *Advances in pharmacological studies of silymarin*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1991;86:79-85.
28. Pradhan SC, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res* 2006;124(5):491-504.
29. De Lira Mota KS, Nunes Dias GE, Ferreira Pinto ME, Ferreira ÂL et al. Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules* 2009;14:979-1012.
30. Suzuki Y, Ishihara M, Segami T, Ito M. Anti-ulcer effects of antioxi-

## Flavonoides y SNC

- dants, quercetin, alpha-tocopherol, nifedipine and tetracycline in rats. *Jpn J Pharmacol* 1998;78(4):435-441.
31. Pharm TK, Vinh PT, Nong HD, Nguyen DK. Flavonoids as antimicrobial agents. *Tap chi Duouc Hoc* 1993;6:14-21.
  32. Nishino C, Enoki N, Tawata S, Mori A et al. Tea flavonoids and microbial disease: A review. *Agric Biol Chem* 1987;51:139-145.
  33. Kujungier A, Tsvetkova J, Serkedjieva Y, Bankova V et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographical origin. *J Ethno Pharmacol* 1999;64:235-240.
  34. Sato M, Fujiwara S, Tsuchiya H, Fujii T et al. Role of flavonoids in microbial diseases. *J Ethnopharmacol* 1996;54:171-178.
  35. Ghazal SA, Abuzarqua M, Mahansneh AM. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Phytother Res* 1992;6:265-271.
  36. Sanabria GA, Ospina SA, Ceronn JA, Raman MJ. Quercetin and related bioflavonoids: A review. *Rev Colomb Cienc Quim Farm* 1991;19:44-51.
  37. Galati EM, Monforte MT, Kirjavainen S, Forestieri AM et al. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmacol* 1994;40(11):709-712.
  38. Loscalzo LM, Wasowski C, Paladini AC et al. Marder. Opioid receptors are involved in the sedative and antinociceptive effects of hesperidin as well as in its potentiation with benzodiazepines. *Eur J Pharmacol*. 2000;580(3):306-313.
  39. K Raj Narayana M, Sripal Reddy MR, Chaluvadi DR. Krishna. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharmacol* 2001;33:2-16.
  40. Paul P, Ritra J, Ritva S, Mackku H et al. Dietary flavonoids and risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol* 1997;146:223-230.
  41. Matsuzaki K, Yamakuni T, Hashimoto M, Haque A et al. Nobiletin restoring  $\beta$ -amyloid-impaired CREB phosphorylation rescues memory deterioration in Alzheimer's disease model rats. *Neurosci Lett* 2006;400(3):230-234.
  42. Nagase H, Omae N, Omori A, Nakagawasa O et al. Nobiletin and its related flavonoids with CRE-dependent transcription-stimulating and neuritegenic activities. *Biochem. Biophys Res Commun* 2005;4(337):1330-1336.
  43. Matsuzaki K, Miyazaki K, Sakai S, Yawo H et al. Nobiletin, a citrus flavonoid with neurotrophic action, augments protein kinase A-mediated phosphorylation of the AMPA receptor subunit, GluR1, and the postsynaptic receptor response to glutamate in murine hippocampus. *Eur J Pharm* 2008;578:194-200.
  44. Nakajima A, Yamakuni T, Haraguchi M, Omae N et al. Nobiletin, a citrus flavonoid that improves memory impairment, rescues bulbecotomy-induced cholinergic neurodegeneration in mice. *J Pharmacol Sci* 2007;105:122-126.
  45. Wolfman C, Viola H, Marder M, Wasowski C et al. Anxiolytic properties of 6,3'-dinitroflavone, a high-affinity benzodiazepine receptor ligand. *Eur J Pharm* 1996;318:23-30.
  46. Olsen WR, Siergart W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of  $\gamma$ -Aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors: Classification, pharmacology and function. Update. *Pharmacol Rev* 2008;60(3):243-260.
  47. Goutman JD, Waxenberg MD, Doñate-Oliver F, Pomata PE et al. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA<sub>A</sub> and receptors GABA<sub>C</sub> receptors. *Eur J Pharmacol* 2003;461:79-87.
  48. Marder M, Viola H, Wasowski C, Fernandez S et al. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;75:537-545.
  49. Martinez MC, Fernandez SP, Loscalzo LL, Wasowski C et al. Hesperidin, a flavonoid glycoside with sedative effect, decreases brain Perki/2 levels in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;92:291-296.
  50. Hanrahan RJ, Chebib M, Johnston ARG. Flavonoid modulation of GABA<sub>A</sub> receptors. *Brit J Pharmacol* 2011;163:234-245.
  51. Hui KM, Huen MS, Wang HY, Zheng H et al. Anxiolytic effect of wogonin, a benzodiazepine receptor ligand isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochem Pharm* 2002;64:1415-1424.
  52. Coleta M, Graca Campos M, Cotrim MD, de Lima TCM et al. Assessment of luteolin (3', 4',5, 7-tetrahydroxyflavone)neuropharmacological activity. *Behav Brain Research* 2008;189:75-82.
  53. Ognibene E, Bovicelli P, Adriani W, Saso L et al.. Behavioral effects of 6-bromoflavanone and 5-methoxy-6, 8-dibromoflavanone as anxiolytic compounds. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 2008;32:128-134.
  54. Nassiri-Asl M, Shariati-Rad S, Zamansoltani F. Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 2008;32:989-993.
  55. Rasilingam D, Duraisamy S, Subramanian R. Anticonvulsant activity of bioflavonoid gossypin. *J Bangladesh Pharmacol Soc* 2009;4:51-54.
  56. Martinez MC, Fernandez SP, Loscalzo LM, Wasowski C et al. Hesperidin, a flavonoid glycoside with sedative effect, decreases brain pERK1/2 levels in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;92:291-296.
  57. Wang LE, Cui XY, Cui SY, Cao JX et al. Potentiating effect of spinosin, a C-glycoside flavonoid of *Semen Ziziphi spinosae*, on pentobarbital-induced sleep may be related to postsynaptic 5-HT1A receptors. *Phytomedicine* 2010;17:404-409.
  58. Meotti FC, Posser T, Missau FC, Pizzolatti MG et al. Involvement of p38MAPK on the antinociceptive action of myricitrin in mice. *Biochem Pharmacol* 2007;74(6):924-931.
  59. Kawabata K, Kawai Y, Tera J. Suppressive effect of quercetin on acute stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis response in Wistar rats. *J Nutr Biochem* 2010;21:374-380.
  60. Li-Tao Y, Jian-Mei L, Yu-Cheng L, Ying P et al. Antidepressant-like behavioral and neurochemical effects of the citrus-associated chemical apigenin. *Life Sci* 2008;82:741-751.
  61. Nagase H, Yamakuni T, Matsuzaki K, Maruyama Y. Mechanism of neurotrophic action of nobiletin in PC12D cells. *Biochemistry* 2005;44:13683-13691.
  62. Lee H, Kim YO, Kim H, Kim SY. Flavonoid wogonin from medicinal herb is neuroprotective by inhibiting inflammatory activation of microglia. *FASEB J* 2003;17:1943-1944.
  63. Li R, Huang YG, Fang D, Le WD. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits lipopolysaccharide-induced microglial activation and protects against inflammation-mediated dopaminergic neuronal injury. *J Neurosci Res* 2004;78:723-731.
  64. Sharma V, Mishra M, Ghosh S, Tewari R et al. Modulation of interleukin-1 $\beta$  mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: Implications in neuroprotection. *Brain Res Bull* 2007;73: 55-63.
  65. Muthiah NS, Viswanathan S, Thirugnanasambantham P, Reddy MK et al. Antiinflammatory activity of flavone and its mono-methoxy derivatives. A structure activity study. *Indian J Pharmacol Sci* 1993;55:180-183.
  66. Lou H, Fan P, Pérez RG, Lou H. Neuroprotective effects of linarin through activation of the PI3/Akt pathway in amyloid- $\beta$  induced neuronal cell death. *Bior Med Chem* 2011;19:4021-4027.
  67. Schroeter H, Boyd C, Spencer JPE, Williams RJ et al. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol Aging* 2002;23:861-880.
  68. Richetti SK, Blank M, Capiotti KM, Piato AL et al. Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. *Behav Brain Res* 2011;217:10-15.
  69. Huang Q, Xiaohui H, Chourong. Pharmacophore/receptor models for GABA<sub>A</sub>/BZ subtypes (a1 b3 g2 a5 g2 a6 b3 g2) Via a comprehensive ligand-mapping approach. *J Med Chem* 2000;43:71-95.
  70. Kahberg P. Refinement and evolution of a pharmacophore model for flavone derivatives binding to the benzodiazepine site of the GABA<sub>A</sub> receptor. *J Med Chem* 2002;45:4188-4201.
  71. Paladini A, Marder M, Medina J. 6-Bromo flavone. A high affinity ligands for the chemical benzodiazepine receptor is a member of family of active flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;223:384-389.
  72. Paladini A, Marder M, Medina J. Detection of benzodiazepine receptor ligands in small libraries of flavone derivatives synthesized by solution phase combinatorial chemistry. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249:481-485.

Estrada-Reyes et al.

73. Paladini A, Marder M, Medina J, Viola H et al. Flavonoids and the Central Nervous System: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. *J Pharm* 1999;51:519-526.
74. Huang X, Liu T, Gu J, Xiaomin L et al. 3D QSAR Model of flavonoids binding at benzodiazepine site in GABA<sub>A</sub> Receptors. *J Med Chem* 2001;44:1883-1891.
75. Machado D, Bettio L, Cunha M, Santos A et al. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and norenergic systems. *Eur J Pharmacol* 2008;587:163-168.
76. Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules? *Free Rad Biol Med* 2004;36(7):838-849.
77. Pérez-Trueba G. Los flavonoides antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cub Invest Biomed* 2003;22(1)1-10.
78. Spencer JPE. Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanism. *Genes Nutr* 2009;4:243-250.

Artículo sin conflicto de intereses

Molecules 2013, 18, 7584-7599; doi:10.3390/molecules18077584

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

## Anxiolytic-Like and Antinociceptive Effects of 2(S)-Neopincirin in Mice

Julia Cassani <sup>1</sup>, Anna G. Escalona Araujo <sup>2</sup>, Mariano Martínez-Vázquez <sup>3</sup>,  
Norberto Manjarrez <sup>1</sup>, Julia Moreno <sup>2</sup> and Rosa Estrada-Reyes <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Mexico D.F. C.P. 04960, Mexico

<sup>2</sup> Laboratorio de Fitofarmacología, Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Calzada Mexico-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Delegación Tlalpan, Mexico D.F, 14370, Mexico

<sup>3</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacan, Mexico D.F. 04510, Mexico

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: restrada@imp.edu.mx or estrarosa@hotmail.com; Tel.: +52-55-4060-5080; Fax: +52-55-5655-9980.

Received: 9 May 2013; in revised form: 12 June 2013 / Accepted: 19 June 2013 /

Published: 28 June 2013

**Abstract:** Study aims: 2(S)-neopincirin (NEO) is a constituent from of *Clinopodium mexicanum*, which is used in traditional Mexican herbal medicine for its tranquilizing and analgesic properties. This study investigated the anxiolytic-like, sedative and antinociceptive effects of NEO in several mice models. *Material and methods:* The anxiolytic-like effect was evaluated in the hole-board (HBT) and Open Field Tests (OFT); sedative effect was evaluated in sleeping time induced by sodium pentobarbital, and its antinociceptive actions were measured in the hot plate test. To evaluate if the GABA receptor could be involved in the anxiolytic-like effect produced by NEO, in independent experiments, the effects produced by co-administration of NEO plus muscimol (MUS) and NEO plus Pitrotoxin (PTX) were evaluated in the HBT. *Results:* NEO was isolated from *Clinopodium mexicanum* leaves. The NMR, MS and optic rotation data helped establish its identity as (2S)-5-hydroxy-4'-methoxyflavanone-7-O- $\{\beta$ -glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -rhamnoside}. NEO showed an anxiolytic-like effect and was able to counter the nociception induced by a thermal stimulus in a dose-dependent manner. PTX blocked the anxiolytic-like effect of NEO, while MUS was able to enhance it. *Conclusions:* The findings of present work demonstrated that NEO possesses anxiolytic-like and antinociceptive effects in mice. Such



Considering the above, the aim of the present work was to evaluate in several mice behavioral paradigms the sedative, anxiolytic-like and antinociceptive effects of the epimer (2*S*)-5-hydroxy-4'-methoxy-flavanone-7-*O*-{ $\beta$ -glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -rhamnoside} (NEO) isolated from leaves of *Clinopodium mexicanum* Benth Govaerts (Lamiaceae).

Anxiolytic-like and sedative effects of NEO were compared with those produced by diazepam (DZ), an anxiolytic and sedative drug commonly used in clinical practice. Furthermore, the effects of picrotoxin (PTX); an antagonist GABAergic and the agonist muscimol (MUS) on the anxiolytic-like effects of NEO were analyzed. NEO was isolated and purified from a methanol crude extract of *C. mexicanum* by chromatography and recrystallization methods. The purity of the isolated compound was determined by HPLC analysis and its structure was elucidated by proton  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , High Performance Liquid Chromatography-Electro Spray Ions-Mass Spectrometry and optical rotation data.

## 2. Results and Discussion

*Clinopodium mexicanum* Benth Govaerts (Lamiaceae) is a plant used in traditional medicine in Central Mexico for its analgesic and tranquilizing properties. Previously we reported the sedative and antinociceptive effects of an aqueous extract of *C. mexicanum* leaves. The occurrence of neoponcirin, a flavanone rutinoside, was described in that paper as one of the major constituents of a complex mixture obtained from methanol and aqueous extracts of *C. mexicanum* [9].

On the other hand, flavonoid compounds exert several effects on the Central Nervous System (CNS), the sedative and depressant effects of some flavanone glycosides, such as linarin, naringin, and hesperidin have extensively been described in particular [10–12]. As we mentioned above, the antianxiety and antinociceptive effects of those compounds have been scarcely explored.

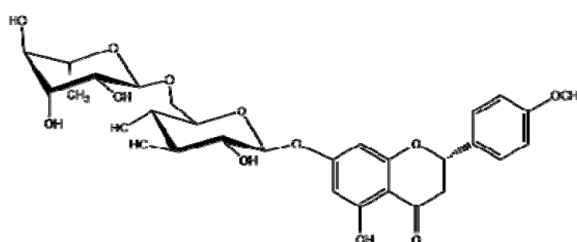
Thus, we decided to evaluate the anxiolytic-like, sedative and antinociceptive effects of the 2*S* epimer of neoponcirin (NEO) in several mice behavioral models. To achieve this aim the isolation and structural characterization of the *S* epimer of neoponcirin was carried out.

### 2.1. Isolation and Identification of 2*S*-Neoponcirin

NEO was isolated from a complex mixture obtained starting from the MeOH extract of *C. mexicanum*, as a white amorphous solid, melting point = 256–258 °C, which MS was consistent with a molecular formula of  $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{14}$  that requires  $[\text{M}^+]$  at  $m/z = 594$  (positive ESI-MS  $m/z$  595  $(\text{M} + \text{H})^+$  and  $[\alpha]_D^{25} = -45^\circ$ . The  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum exhibits signals of 28 carbon atoms, including one methoxyl carbon, one methyl, two methylenes, seventeen methines and seven quaternary carbons, which were assigned with the aid of Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT), Heteronuclear Single-Quantum Correlation (HSQC) and Heteronuclear Multiple-Bond Correlation (HMBC) experiments. In the NMR spectra typical signal systems for the A and B rings of flavonoid compounds were observed. The proton spectrum showed a set of signals of an AA'BB' system at  $\delta$  7.45 and 6.98 ppm corresponding to the H-2', 6' and H-3', 5' protons of the ring B. The assignment was further confirmed by the  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum (128 for C-2'/C-6' and 113 for C-3'/C-5', other characteristic signals are that showed the presence of meta coupled signals at  $\delta$  6.12 ppm and these were assigned to H-6 and H-8 of the ring A respectively, corresponding to C-6 at 96.5 and C-8 at 95.5 ppm. These observations suggested that the C-5 and C-7 positions were oxygenated, the substitution of

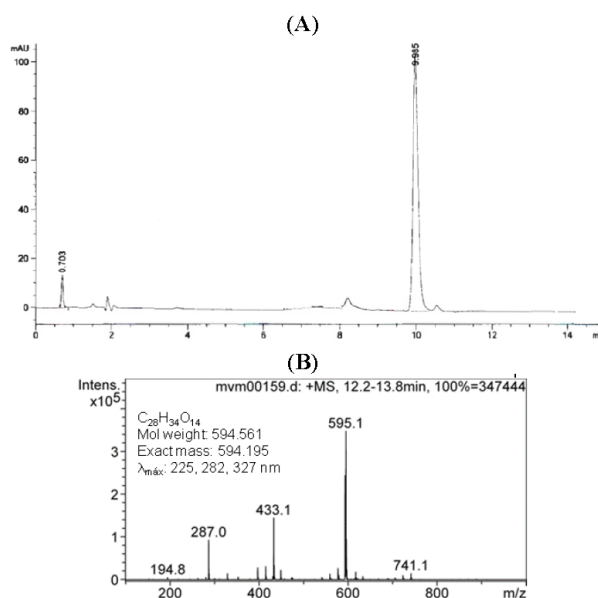
C-5 was confirmed by the presence of a double signal at 4.98 ppm in the  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum whose coupling constant ( $J = 7.5$  Hz) corresponds to one proton of a glucose in the  $\beta$  position. The most remarkable signal is the one that shows the interaction between the  $\text{H}_2$  and  $\text{H}_3$  (ax) with a long coupling constant of  $J_{2,3} = 12.6$  Hz that indicates that configuration of C-2 aryl group of heterocyclic ring is equatorial, which implies that the molecule has a  $2S$  configuration, as shown in Figure 1. The spectra data all together thus helped to establish its structure as  $(2S)$ -5-hydroxy-4'-methoxyflavanone-7- $O$ - $\{\beta$ -gluco-pyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -rhamnoside).

Figure 1. Structure of NEO.



Performance Liquid Chromatography (Chiral-HPLC) results (Figure 2) showed that  $(S)$ -neoponcirin was obtained as a single epimer, with 98% of purity and the negative optical rotation value also confirmed that this corresponds to the  $2S$  diastereoisomer [13].

Figure 2. Chromatogram (A) and mass spectrum of NEO (B).

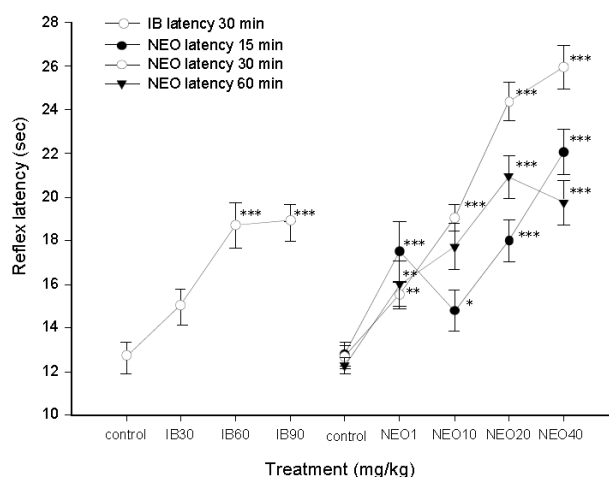


## 2.2. Pharmacological Evaluations

### 2.2.1. Antinociceptive Effect of NEO

The antinociceptive effect of NEO was evaluated in the hot plate thermal stimulation model, which has been widely used to evaluate analgesic effects mediated by central mechanisms [14]. As shown in Figure 3 ibuprofen (IB) was effective to prolonging the reflex latency response respect to the control group, similarly the i.p. administration of NEO at doses of 1, 10, 20 and 40 mg/kg produced a statistically significant increase in the reflex latency response, showing better effect at 30 min later of i.p. administration (−15 min:  $F_{7,56} = 7.335$ ,  $p \leq 0.001$ , −30 min:  $F_{7,64} = 10.924$ ,  $p < 0.001$ , and −60 min:  $F_{7,64} = 5.534$ ,  $p < 0.001$ ). These results showed that NEO exerts a dose-dependent antinociceptive effect against thermal stimulus, this effect was better than that produced by IB; a potent non-opioid analgesic (NSAIDs) which has been reported to be effective in the hot plate test [15]. Thus, when comparing the actions of NEO with those of IB, it can be observed that NEO is clearly more potent than IB.

Figure 3. Effect antinociceptive of ibuprofen (IB) and NEO in the hot plate test.

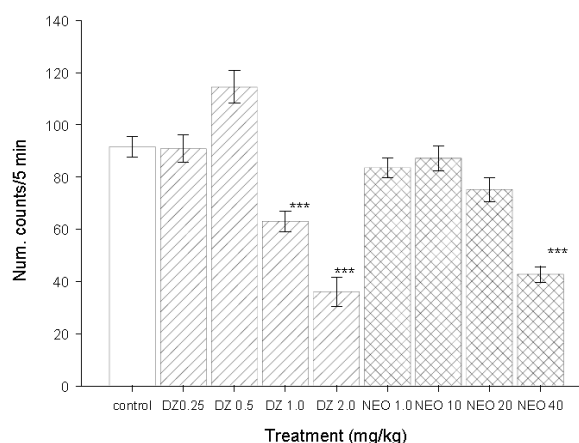


All values are presented as means  $\pm$  S.E.M,  $n = 8-10$  animals for each group. Comparisons were made by using One Way Analysis of Variance; Administration latency 15 min:  $F(7, 56) = 7.335$ ,  $p \leq 0.001$ ; Administration latency 30 min:  $F(7, 64) = 10.924$ ,  $p < 0.001$ ; Administration latency 60 min:  $F(7, 64) = 5.534$ ,  $p < 0.001$ , followed by a multiple comparisons versus control group by Dunnett's method, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.1$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Furthermore, the antinociceptive effects produced by NEO are not associated with any adverse effects since these doses did not induce hyper- or hypo-locomotion or any other visible motor disturbances, such as rigidity or tremor in the experimental animals when tested in the Open Field (Figure 4). Only at highest dose NEO (40 mg/kg) produced a decrease in the ambulatory activity of mice, which could interfere with its antinociceptive effect. The findings showed that NEO is an active principle of *C. mexicanum*, and highlights its pharmacological potential for the development of new analgesics drugs.

Figure 4 shows the actions of NEO on the ambulatory activity of experimental animals. This natural molecule did not induce any change in the behavior of animals. Only at 40 mg/kg did NEO induce a decrease in the number of counts in the open field. In general a reduction in animals' activity could be probably due to sedative actions. However, NEO did not show effects in the sleeping time test thus, this could be attributed to nonspecific effects.

**Figure 4.** Effects of diazepam (DZ) and 2(S)-neoponcirin on locomotor activity.



All results are expressed as means  $\pm$  SEM of 8–10 animals per group. Comparisons were made by using Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks followed by the Mann-Whitney *U* test: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p = 0.001$ . Kruskal-Wallis test data:  $H = 59.37$ ,  $fd = 8$ ,  $p \leq 0.001$ ; <sup>a</sup> control vs. DZ 0.25;  $T = 81.5$ ,  $P = 0.65$ ; <sup>b</sup> control vs. DZ 0.5;  $T = 94.5$ ,  $p = 0.10$ ; <sup>c</sup> control vs. DZ 1.0;  $T = 36.0$ ,  $p \leq 0.001$ ; <sup>d</sup> control vs. DZ 2.0;  $T = 36$ ,  $p \leq 0.001$ ; <sup>e</sup> control vs. NEO1.0;  $T = 78.5$ ,  $p \leq 0.36$ ; <sup>f</sup> control vs. NEO10;  $T = 88.5$ ,  $p \leq 0.93$ ; <sup>g</sup> control vs. NEO 20;  $T = 45.0$ ,  $p \leq 0.001$ ; <sup>h</sup> control vs. NEO 40;  $T = 45.0$ ,  $p \leq 0.001$ .

### 2.2.2. Test of Sodium Pentobarbital-induced Sleeping Time

NEO administration did not produce changes in neither the latency sedation nor the sleeping time induced by sodium pentobarbital. These results indicate that the NEO did not exert sedative effects (data no showed) at any of the doses tested. In this respect, it has been described that pentobarbital allosterically enhances the GABAergic neurotransmission by increasing the average open time of channel in a GABA-dependent fashion [16,17]. It is therefore possible that NEO is unable to modify this mechanism.

### 2.2.3. Hole-Board Test

The hole-board test has been extensively used to detect anxiety-like effects produced in mice by drugs or active principles from medicinal plants [18]. Table 1 shows the effects of both DZ (0.5–4.0 mg/kg) and NEO (1–40 mg/kg) on the performance of mice in the hole-board test. In a similar manner, both treatments at low doses (NEO at 1 to 10 mg/kg and DZ at 0.5 mg/kg) significantly increased the head dipping number ( $H = 57.75$ ,  $df = 8$ ,  $p \leq 0.001$ ) and the rearing number ( $H = 61.73$ ,  $df = 8$ ,  $p \leq 0.001$ ) relative to the group control. Interestingly, in this test, both DZ and NEO at the

highest doses tested had no effect. This lack of anxiolytic-like effect of both DZ and NEO at the dose of 4.0 mg/kg and 40 mg/kg respectively could be due to a sedative action, since at the same dose those drugs significantly decreased general activity as measured in the open field test. Thereby, NEO showed a pharmacological biphasic profile similar to that of DZ, a classic benzodiazepine, which at small doses causes anxiolytic effects while sedative effects are observed at increasing doses. In this regard, it is well known that benzodiazepines such as diazepam produce anxiolytic effects in humans and anxiolytic-like responses in most animal models through their interaction with the GABAergic system. These facts suggest that the GABAergic system could be involved in the anxiolytic effects produced by NEO.

**Table 1.** Effect of NEO on the performance of mice in the hole-board test.

Treatment (mg/kg)	RN	HDN
	Mean $\pm$ SEM	Mean $\pm$ SEM
Control	10.37 $\pm$ 0.80	26.12 $\pm$ 1.55
1.0	17.5 $\pm$ 1.74 **	32.33 $\pm$ 2.16 *
10.0	20.70 $\pm$ 0.98 ***	38.20 $\pm$ 3.33 **
20.0	5.0 $\pm$ 1.08 ++	24.77 $\pm$ 1.98
40.0	1 $\pm$ 0.50 +++	6.8 $\pm$ 3.88 +++
DZ 0.5	20.25 $\pm$ 1.66 ***	42.27 $\pm$ 1.55 **
DZ 1.0	13.44 $\pm$ 2.28	34.55 $\pm$ 3.12
DZ 2.0	9.66 $\pm$ 2.27	30.55 $\pm$ 3.61
DZ 4.0	3.08 $\pm$ 0.81 +++	0.8 $\pm$ 0.44 +++
	$H = 61.73, fd = 8$ ( $p \leq 0.001$ )	$H = 57.75, fd = 8$ ( $p \leq 0.001$ )

All results are expressed as means  $\pm$  SEM of 8–10 animals per group. Comparisons were made by using Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks followed by the Mann-Whitney  $U$  test: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  and \*\*\*  $p \leq 0.001$  (\*, \*\*, and \*\*\* symbol used to symbolize significant increases; +++ symbol used to symbolize significant decreases).

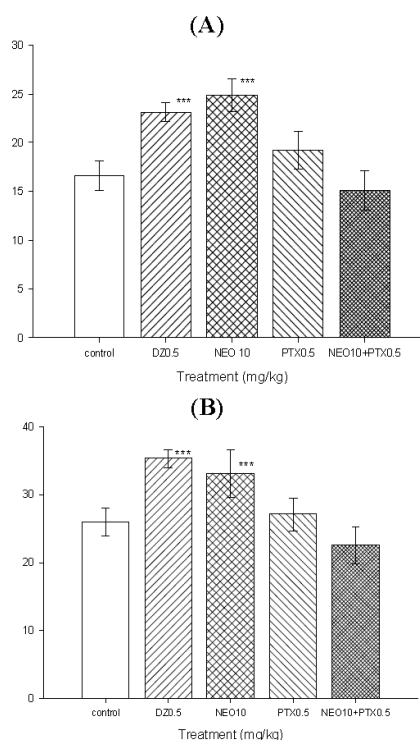
Benzodiazepines mainly exert their effects through interaction with the GABAergic system. The GABA<sub>A</sub> receptors are the predominant receptors for GABAergic neurotransmission, when the endogenous GABA binds to GABAergic receptors at the GABA-binding site, the conductance to Cl<sup>-</sup> ion increases in the neuronal membrane, which results in a hyperpolarization. This polarization in turn, leads to a reduced neuronal excitability [19]. The benzodiazepines are positive modulators of GABAergic neurotransmission, *i.e.*, GABA is required to produce the anxiolytic actions of benzodiazepines [20–22], whilst, GABAergic agonists such as muscimol interact directly with the GABA binding site to activate Cl<sup>-</sup> ion conductance, and thus function even in the absence of GABA. In contrast agents that inhibit GABAergic neurotransmission are anxiogenic, for example, the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist picrotoxin, produces anxiogenic-like effects in mice. Picrotoxin is a selective non-competitive antagonist of GABA that specifically blocks the GABA<sub>A</sub> receptor [16] thereby preventing the neuronal inhibitory effect of GABA. On the other hand, it is well known that many flavonoid compounds exert their anxiolytic and sedative effects through their direct or indirect actions on the GABAergic system [23,24]. Based on the hypothesis that GABAergic system could contribute to the

anxiolytic actions of NEO, the co-administration of picrotoxin and MUS in combination with NEO was evaluated.

#### 2.2.4. Picrotoxin Blockade and Muscimol Synergism Experiments

In order to explore possible participation of GABAergic system in NEO anxiolytic effects, the effects of picrotoxin and muscimol on the anxiolytic-like effect of NEO were analyzed. As it can be seen in Figure 5, NEO (10 mg/kg) significantly increased the rearing number ( $24.87 \pm 1.69$ ) and the head dipping number ( $34.12 \pm 2.5$ ) in respect to control group (rearing number =  $16.62 \pm 1.54$  and head dipping number =  $24 \pm 2.0$ ) in the hole-board test, when NEO was simultaneously administrated with PTX (0.5 mg/kg), the GABAergic antagonist picrotoxin was able to completely abolish the anxiolytic-like effect of NEO as the results of Mann-Whitney test showed no significant differences in rearing number, neither in head dipping number between vehicle-treated group and NEO (10 mg/kg) plus picrotoxin group (0.5 mg/kg) (rearing number;  $15.20 \pm 2.03$ ;  $T = 81$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0.19$ ) and head dipping number ( $27.12 \pm 2.4$ ;  $T = 72$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0.72$ ) were observed (Figure 5).

**Figure 5.** Effects of picrotoxin (PTX) on the anxiolytic-like effects of NEO in hole-board test. (A) Rearing number vs. treatment; (B) Head dipping number vs. treatment.



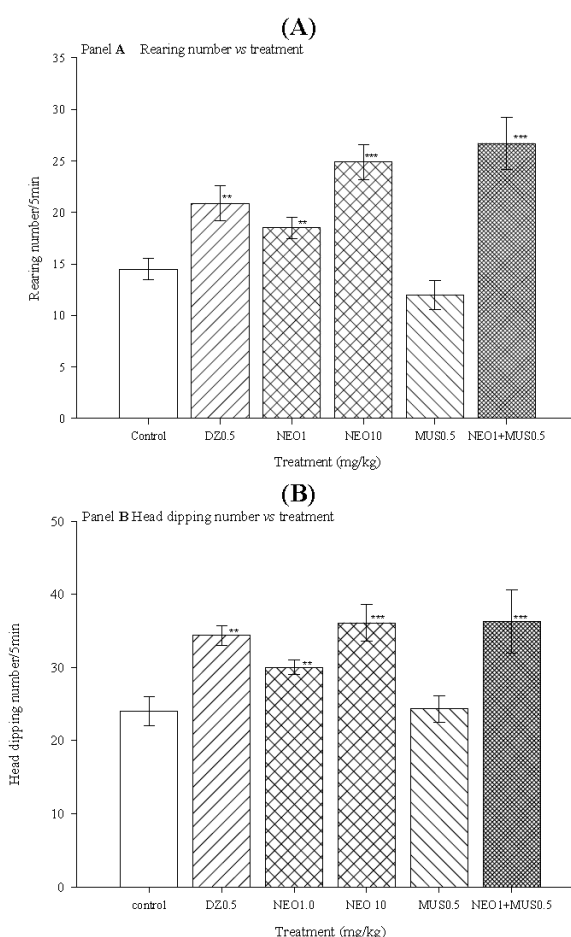
All results are expressed as means  $\pm$  SEM of 8–10 animals per group. Comparisons were made by using Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks followed by the Mann-Whitney  $U$  test: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p = 0.001$ .

As shown by these results, the combination of PTX plus NEO was able to completely abolish the anxiolytic-like effects of NEO; this suggests that NEO could facilitate GABAergic transmission [25,26].

On the other hand, a sub-threshold dose of MUS, which is a specific agonist to the GABA<sub>A</sub> receptor [16] was able to synergize with a non-effective dose of NEO (1 mg/kg) and produced anxiolytic-like effects in HBT, noted as an increase in both rearing and head dipping number when compared with muscimol-treatment alone and NEO-treatment (1 mg/kg) alone, this anxiolytic-like effect was similar to the one obtained with NEO at 10 mg/kg; (rearing number:  $H = 27.65$ ,  $df = 4$ ,  $p \leq 0.001$ , head dipping number:  $H = 15.36$ ,  $df = 4$ ,  $p = 0.004$ ) (Figure 6). The anxiolytic-like effects observed when the animals were simultaneously administered with MUS and NEO supports the idea that NEO could interact directly with the GABA binding site in a similar way to the agonist MUS.

**Figure 6.** Effect of co-administration of muscimol (MUS) plus NEO in hole-board test.

(A) Rearing number vs. treatment; (B) Head dipping number vs. treatment.



All results are expressed as means  $\pm$  SEM of 8–10 animals per group. Comparisons were made by using Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks followed by the Mann-Whitney  $U$  test: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p = 0.001$ .

These results are a good index of the GABAergic system participation on the anxiolytic actions of NEO; furthermore, this fact suggests that NEO could exert its anxiolytic-like effect through the interaction with the GABA<sub>A</sub> receptors. However, future experiments could be conducted to determine the specific form of action.

Our findings indicate that the molecular target of NEO to exert its actions is, at least partially, the central GABAergic system, producing an anxiolytic-like effect in mice. Nonetheless, NEO could also interact with other neurotransmitter systems, such as the serotonergic, dopaminergic, noradrenergic, metabotropic systems of the GABA<sub>B</sub> receptor or the opioid system that could contribute to the anxiolytic-like effects and even more to the antinociceptive effects of NEO. For example, it is well accepted that the opioids system plays a role in the anxiolytic actions of benzodiazepines, and they also modulate affective behaviors. Several studies have shown that opioid antagonists such as naloxone can block the anxiolytic responses to benzodiazepines [27,28], furthermore, it has been reported that the flavonol glucoside; gossypin activates opioid receptors, as it exhibits analgesic effects that are antagonized by the opioids antagonist naloxone [29,30]. However, further studies currently in progress will enable us to understand the mechanism of action underlying and its possible relationship with the NEO anxiolytic properties observed in this investigation.

### 3. Experimental

#### 3.1. General

The solvents used in this work were purchased from Aldrich (Aldrich Co., Toluca de Lerdo, Mexico). Chromatography was performed using an open column packed with 60 G F<sub>254</sub> Merck silica gel at a ratio of 1:15 in respect to the extract. The chromatographic columns (CC) were monitored by thin layer chromatography TLC, and developed plates were visualized under a short and long-wave UV lamp and heating plates that were dipping in Ce<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and/or NH<sub>4</sub>OH solutions. Melting points, were determined with a Fisher-Johns apparatus, and are uncorrected. Optical rotation was measured at 254 nm on a Perkin Elmer 341 digital polarimeter using a 100 mm cell and MeOH was used as solvent. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) and <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) experiments were conducted on a Varian Mercury 400 MHz instrument spectra data using TMS as internal standard and DMSO-*d*<sub>6</sub> (99.9% D) was used as solvent. Chemical shifts are reported in ppm with respect to TMS (tetramethylsilane; δ = 0), and *J* are reported in Hz. The identity and purity of the isolated compound were confirmed by comparison of their physical and spectral properties (<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, and MS) with those reported in the literature, and through HPLC-ESI-MS analysis

#### 3.2. Plant Material

Leaves of *Clinopodium mexicanum* Benth. Govaerts (Lamiaceae), were collected in Chilapa, Guerrero State, Mexico. The species was authenticated by botanist M. R. García Peña, and a voucher specimen was deposited in the Herbario del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU No. 946030).



### 3.3. Isolation and Identification of 2*S*-Neoponcirin

Dried and finely ground *C. mexicanum* (100 g) was extracted successively with hexane (Hx), ethyl acetate (EtOAc), and methanol (MeOH). Evaporation of the solvents under vacuum yielded the respective extracts. The methanol extract was fractionated on a silica gel column; eluted with a hexane-ethyl acetate gradient (9:1→1:9) followed of ethyl acetate. From the fractions eluted with EtOAc: MeOH (1:1) of MeOH crude extract, a complex mixture of whitish solid was obtained by precipitation (2.56 g). The <sup>1</sup>H-NMR data revealed the presence of neoponcirin, naringenin and hesperidin in this mixture. The mixture obtained was separated by CC using Sephadex LH 20 as phase solid and a mixture of ethanol: water (9:1) was employed as eluent, from this column 0.905 g of neoponcirin was obtained through re-crystallizations as an amorphous white solid with decomposition point 256–258 °C in a EtOAc:MeOH system. Optic rotation  $[\alpha]_D^{25} = -45^\circ$  (0.002 g/mL in MeOH).

In order to determine the purity of NEO, an analytical method was developed using high performance liquid chromatography (HPLC). The analysis was carried out with an Agilent model 1264 analytical HPLC. Chromatographic conditions were as follows: a chiral column: Chiracel OD-RH, the mobile phase was acetonitrile-water system (ACN:H<sub>2</sub>O) with a program ramp 20:80 to 80:20 v/v at 0 min to 20 min, flow-rate was 1 mL/min and the injection volume was 5 µL of concentrate solution of NEO in water. The temperature was established and set at 25 °C, and the detection wavelength was 254 nm. The purity of NEO was quantified by its HPLC peak as % relative area. The HPLC peak area was not corrected for response factors. NEO was obtained with a 98% of purity, with an RT = 6.04 min, and according to its optical rotation value, this corresponds to the 2*S* isomer.

Additionally, a positive ion mass spectrum of the column eluted was recorded in electrospray mass spectrometry (ESI-MS) in the range of m/z 100–1,000 amu with a scan cycle time of 2 s. ESI-IT source conditions were adjusted as follows: drying N<sub>2</sub> at 10 L/min, capillarity temperature = 350 °C, spray voltage = 40.0 volts, auxiliary gas pressure = 30 psi [9].

The NMR data are as follows: <sup>1</sup>H-NMR δ 12.0 (1H, s broad, int-D<sub>2</sub>O, C<sub>5</sub>-OH), 7.45 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-2', 6'), 6.98 (2H, d, *J* = 8.7, H-3', 5'), 6.12 (2H, d, *J* = 2.8 Hz, H-6, 8), 5.57 (1H, dd, *J* = 2.8, 12.6 Hz, H-2), 4.98 (1H, d, *J* = 7.5 glc H-1''), 4.52 (1H, s broad, rha H-1'''), 3.80 (1H, H-6a''), 3.76 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.65 (1H, H-2'''), 3.54 (1H, H-5''), 3.44 (1H, H-3'''), 3.43 (1H, H-6b''), 3.39 (1H, H-5'''), 3.28 (1H, H-3''), 3.23 (1H, H-2''), 3.16 (1H, H-4'''), 3.14 (1H, H-4''), 3.36 (1H, dd, *J* = 12.6, 17.1 Hz, H-3a), 2.77 (1H, dd, *J* = 2.7, 17.1 Hz, H-3b), 1.09 (3H, d, *J* = 6.23 Hz, H-6'''). <sup>13</sup>C-NMR δ 197 (C-4), 165 (C-7), 162.9 (C-5), 162.6 (C-9), 159.5 (C-4'), 130 (C-1'), 128 (C-2', 6'), 113 (C-3', 5'), 103.3 (C-10), 100.5 (C-1'', C anomeric-glc), 99.4 (C-1''', C anomeric-rha), 96. (C-6), 95.5 (C-8), 78.1 (C-2), 76.2 (C-5''), 75.6 (C-3''), 72.8 (C-2''), 70.7 (C-4'''), 70.1 (C-3'''), 69.6 (C-2'''), 69.5 (C-4''), 68.3 (C-5'''), 66 (C-6''), 55 (OCH<sub>3</sub>), 41.7 (C-3), 17.9 (C-6''').

### 3.4. Pharmacological Evaluations

#### 3.4.1. Animals

Adult male Swiss Webster mice (20–30 g) were obtained from the vivarium at the Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (México, D.F., Mexico). All animals were housed eight per cage in a temperature-controlled (20–21 °C) room under inverted light:dark conditions (12:12 h,

lights on at 22:00 h). All behavioral evaluations were performed between 10:00 and 14:00 h. Animals had *ad libitum* access to Purina rodent chow and water. Animals were handled in agreement to the general principles of laboratory animal care (publication # 85–23, revised in 1985) [31] and the ‘Norma Oficial Mexicana’ (NOM-062-ZOO-1999) further, the experimental protocol was approved by the local ethical committee (NC093620.0). All the experimental sessions were videotaped and analyzed by an observer unaware of the treatment conditions. For habituation, animals received a daily i.p. injection of saline solution (0.1 mL/10 g) for five days before treatments were initiated. Diazepam (intraperitoneal route; i.p.) was used as a reference drug in both the sedative and antianxiety tests, and ibuprofen (IB; via i.p.) was used as control group in the antithermonociceptive test. Doses for the NEO were determined in previous pilot studies carried out in our laboratory.

#### 3.4.2. Drug Preparation and Dosage

All drugs in this study were intraperitoneally (i.p.) injected in a total volume of 10.0 mL/kg body weight. Sodium pentobarbital (SP, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was dissolved in an isotonic solution (0.9% NaCl), diazepam (DZ, Hoffmann-La Roche, Mexico City, Mexico) and ibuprofen (IB, Aldrich-Sigma, Mexico City, Mexico), muscimol (MUS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), picrotoxin (PTX, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), were dissolved in 1.0% propylene glycol (Pg 600). Control animals received the same volume of the vehicle (isotonic saline, 0.9% NaCl). The pharmacological assays were performed with aqueous dilutions of the NEO containing 1%–2% Tween 80. Doses are expressed as milligrams of NEO per kilogram of body weight for each mouse.

#### 3.4.3. Hot Plate Test

A total of twenty-two groups of eight mice each were employed in the hot plate test. Twelve independent groups were administered NEO intraperitoneally at doses of 1.0, 10, 20 or 40 mg/kg, and were evaluated in three independent experiments carried out at 15, 30 and 60 min (latency time) before the beginning of the test. Another group administered only with saline solution was used as control. These experiments were carried out in order to establish the administration latency of NEO. In the same form, three independent groups of animals were treated with ibuprofen at 30, 60 and 90.0 mg/kg doses to 30 min before beginning the test. These groups served as positive controls.

In this test, each mouse was introduced into a glass cylinder (20 cm in diameter and 25 cm in height) placed at the center of a metal plate (Uge baseline, model DS 37) adjusted to  $53 \pm 0.5$  °C. Within several seconds, the animals displayed specific responses evoked by the thermal stimulation, including the flexor antialgesic reflex behavior. If the mouse did not respond within 50 seconds, the test was terminated, and the mouse was immediately removed from the hot plate to avoid tissue damage and returned to its home cage. Animals were tested one at a time and were not habituated to the apparatus prior to testing. Each animal was tested only once [9,15].

#### 3.4.4. Open Field Test

NEO was administered at doses of 1, 10, 20, and 40 mg/kg (i.p.) to four independent groups of mice and spontaneous locomotor activity was measured 30 min after of administration. The Open Field Test

involves an apparatus made of an opaque-Plexiglas box (40 cm × 30 cm × 20 cm) with the floor divided into 12 equal squares. Each animal was gently placed in a corner of the apparatus and its behavior was videotaped during a 5 min session. A blind observer registered the number of times the animal entered each square (counts per 5 min). A count is considered when the animal totally crosses from a square to the next. A change in the number of counts respect to control group is considered as an alteration of locomotor activity [25].

#### 3.4.5. Test of Sodium Pentobarbital-Induced Sleeping Time

The sedative and hypnotic effects of NEO in combination with sodium pentobarbital (SP) were evaluated. For this purpose, a total of 64 mice were divided into eight groups (n = 8). Five groups received NEO (1.0, 10, 20, and 40.0 mg/kg i.p., respectively) 30 min before the administration of SP (42 mg/kg, i.p.). Two other groups received DZ (0.5 and 1.0 mg/kg, i.p., respectively) 30 min before the administration of SP (42 mg/kg, i.p.); these two groups served as positive controls. An independent group was injected with the vehicle 30 min before the i.p. administration of the 42 mg/kg dose of SP, and this group served as a negative control. Each mouse was placed on a warm table and carefully observed for the onset of uncoordinated movements corresponding to the sedative phase of the test. Loss of the righting reflex related to the hypnosis phase and the duration of sleep were also observed. The time elapsed between the loss and recovery of the righting reflex was considered as the sleeping time [32].

#### 3.4.6. Hole-Board Test

The hole-board set-up apparatus is a wooden box of 60 cm × 30 cm × 30 cm with four equidistant holes (2 cm diameter) on the floor. NEO was administered at increasing doses (1.0, 10, 20 and 40 mg/kg, i.p.) to independent groups of eight mice each. After 30 min, each mouse was placed in the center of the hole-board and the number of head-dips into the holes and the number of rears was recorded over a 5 min period. A head-dip was registered if a mouse put its head in a hole at least up to the eye level; repeated dips into the same hole were not counted unless these were separated by locomotion and rearing is scored when mice stand up themselves on the hind legs and the fore-paws rest on a partition wall.

Four independent groups of eight animals received DZ (0.5, 1, 2, and 4 mg/kg) 30 min before the test was conducted and these groups served as a reference. One group receiving only the vehicle served as a control. An increase in both the number of head-dips and the number of rears compared to the controls were considered to indicate an anxiolytic effect, while a decrease of those was considered as a sedative effect. After each trial, the floor of the apparatus was carefully cleaned to remove traces of previous paths [9].

#### 3.4.7. Picrotoxin Blockade Experiments

To explore the role of GABA system in CNS anxiolytic-like effects of NEO the pre-treatment with picrotoxin (PTX) was employed to attempt blocking the pharmacological effect of NEO in the hole-board test. NEO to 10 mg/kg dose was selected for this assay. PTX (0.5 mg/kg) and NEO were administered 30 min and 25 min, respectively, prior to testing.

#### 3.4.8. Muscimol Synergism Experiments

To explore the possible synergistic effect of muscimol (MUS) on anxiolytic-like effect of NEO, the experimental animals were co-administered with NEO (1 mg/kg) and a sub-threshold dose of MUS (0.5 mg/kg), 30 min before set on test. Doses selected for these experimental series were chosen based on the results obtained in the first hole-board experiment.

#### 3.5. Statistical Analysis

When the differences between treated and control groups data did not meet normality or variance equality criteria, were analyzed using the non-parametric tests of Kruskal-Wallis analysis of variance on ranks (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ ), followed by the Mann-Whitney Rank Sum test. Whereas, data did meet normality or variance equality criteria, the significance was assessed by a one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparisons test.

### 4. Conclusions

The findings of the present work demonstrated that the (2*S*)-5-hydroxy-4'-methoxy flavanone-7-*O*- $\{\beta$ -glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -rhamnoside} isomer of neoponcirin produces antinociceptive and anxiolytic-like effects in mice. Our findings contributed at least partially to identify the mechanism subjacent to anxiolytic-like effect produced for neoponcirin, which involves the participation of GABA<sub>A</sub> receptor. On the basis of the present results it may be suggested that 2(*S*)-neoponcirin might be of interest as an anxiolytic drug for the treatment of anxiety and for treatment of pain. Additionally, these observations support the idea that to *C. mexicanum* possess analgesic and sedative properties may be due to the presence of 2(*S*)-neoponcirin. Finally, the present paper contributes to our knowledge about active principles from medicinal plants used in Mexican traditional medicine. It shows its potential for the development of new and better analgesic and anxiolytic drugs.

#### Acknowledgments

We wish to thank Karla Jiménez Vázquez for her technical assistance. Partial support from project No. 190 of Fondo de apoyo para proyectos de Investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz Project NC093620.0.

#### Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

#### References and Notes

1. Sharma, V.; Mishra, M.; Ghosh, S.; Tewari, R.; Basu, A.; Seth, P.; Sen, E. Modulation of interleukin-1 $\beta$  mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: Implications in neuroprotection. *Brain Res. Bull.* **2007**, *73*, 55–63.
2. Paul, P.; Ritva, J.; Ritva, S.; Mackku, H.; Lyly, T.; Eero, P.; Arpo, A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol.* **1997**, *26*, 167–181.

3. Knekt, P.; Järvinen, R.; Seppänen, R.; Heliövaara, M.; Teppo, L.; Pukkala, E.; Aromaa, A. Dietary flavonoids and risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol.* **1997**, *146*, 223–230.
4. Matsuzaki, K.; Yamakuni, T.; Hashimoto, M.; Haque, A.M.; Shido, O.; Mimaki, Y.; Sashida, Y.; Ohizumi, Y. Nobiletin restoring  $\beta$ -amyloid-impaired CREB phosphorylation rescues memory deterioration in Alzheimer's disease model rats. *Neurosci. Lett.* **2006**, *400*, 230–234.
5. Matsuzaki, K.; Miyazaki, K.; Sakai, S.; Yawo, H.; Nakata, N.; Moriguchi, S.; Fukunaga, K.; Yokosuka, A.; Sashida, Y.; Mimaki, Y.; *et al.* Nobiletin, a citrus flavonoid with neurotrophic action, augments protein kinase A-mediated phosphorylation of the AMPA receptor subunit, GluR1, and the postsynaptic receptor response to glutamate in murine hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *578*, 194–200.
6. Nakajima, A.; Yamakuni, T.; Haraguchi, M.; Omae, N.; Si-Young, S.; Kato, C.; Nakagawasai, O.; Tadano, T.; Yokosuka, A.; Mimaki, Y.; *et al.* Nobiletin, a citrus flavonoid that improves memory impairment, rescues bulbectomy-induced cholinergic neurodegeneration in mice. *J. Pharmacol. Sci.* **2007**, *105*, 122–126.
7. Medina, J.H.; Peña, C.; Levi de Stein, M.; Wolfman, C.; Paladini, A.C. Benzodiazepine-like molecules, as well as other ligands for the brain benzodiazepine receptors, are relatively common constituents of plants. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1989**, *165*, 547–553.
8. Medina, J.H.; Paladini, A.C.; Wolfman, C.; Levi de Stein, M.; Calvo, D.; Diaz, L.E.; Peña, C. Chrysin (5,7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 2227–2231.
9. Estrada-Reyes, R.; Martínez-Vázquez, M.; Gallegos-Solís, A.; Heinze, G.; Moreno, J. Depressant effects of *Clinopodium mexicanum* benth. Govaerts (lamiaceae) on the central nervous system. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *130*, 1–8.
10. Martínez, M.C.; Fernández, S.P.; Loscalzo, L.L.; Wasowski, C.; Paladini, A.C.; Marder, M.; Medina, J.H.; Viola, H. Hesperidin, a flavonoid glycoside with sedative effect, decreases brain Per1/2 levels in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2009**, *92*, 291–296.
11. Fernández, S.; Wasowski, C.; Paladini, A.C.; Marder, M. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2004**, *77*, 399–409.
12. Fernández, S.P.; Wasowski, C.; Loscalzo, L.M.; Granger, R.E.; Johnston, G.A.; Paladini, A.C.; Marder, M. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *13*, 168–176.
13. Slade, D.; Ferreira, D.; Marais, J.P.J. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2177–2215.
14. Al-Ghamdi, M.S. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76*, 45–48.
15. Wesolowska, A.; Nikiforuk, A.; Michalska, K.; Kisiel, W.; Chojnacka-Wójcik, E. Analgesic and sedative activities of lactucin and some lactucin-like guaibolides in mice. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *107*, 254–258.
16. Petty, F. GABA and mood disorders: A brief review and hypothesis. *J. Affect. Disord.* **1995**, *34*, 275–281.
17. Leeb-Lundberg, F.; Snowman, A.; Olsen, W.R. Barbiturate receptor sites are coupled to benzodiazepine receptors. *Neurobiology* **1980**, *77*, 7468–7472.

18. Takeda, H.; Tsuji, M.; Matsumiya, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *350*, 21–29.
19. Nolan, N.A.; Parkes, M.W. The effects of benzodiazepines on the behaviour of mice on a hole-board. *Psychopharmacology* **1973**, *29*, 277–288.
20. Ashton, H. Guidelines for the rational use of benzodiazepines. When and what to use. *Drugs* **1994**, *48*, 25–40.
21. Smith, T.A. Type A gamma-butyric acid (GABA<sub>A</sub>) receptor subunits and benzodiazepine binding: Significance to clinical syndromes and their treatment. *Br. J. Biomed. Sci.* **2001**, *58*, 111–121.
22. Treit, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1985**, *9*, 203–222.
23. Hanrahan R.J.; Chebib, M.; Johnston, A.R.G. Flavonoid modulation of GABA<sub>A</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *163*, 234–245.
24. Meotti, F.C.; Posser, T.; Missau, F.C.; Pizzolatti, M.G.; Leal, R.B.; Santos, A.R. Involvement of p38MAPK on the antinociceptive action of myricitrin in mice. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 924–931.
25. López-Rubalcava, C.; Piña-Medina, B.; Estrada-Reyes, R.; Heinze, G.; Martínez-Vázquez, M. Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimolia* in two anxiety paradigms: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Sci.* **2006**, *78*, 730–737.
26. Kumar, A.; Singh, A. Possible involvement of GABAergic mechanism in protective effect of melatonin against sleep deprivation-induced behaviour modification and oxidative damage in mice. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2009**, *23*, 439–448.
27. Tsuda, M.; Suzuki, T.; Misawa, M.; Nagase, H. Involvement of the opioid system in the anxiolytic effect of diazepam in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, *307*, 7–14.
28. Gear, R.W.; Miaskowski, C.; Heller, P.H.; Paul, S.M.; Gordon, N.C.; Levine, J.D. Benzodiazepine mediated antagonism of opioid analgesia. *Pain* **1997**, *71*, 25–29.
29. Viswanathan, S.; Sambantham, P.T.; Reddy, K.; Kameswaran, L. Gossypin-induced analgesia in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **1984**, *98*, 289–291.
30. Loscalzo, L.M.; Wasowski, C.; Paladini, A.C.; Marder, M. Opioid receptors are involved in the sedative and antinociceptive effects of hesperidin as well as in its potentiation with benzodiazepines. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *580*, 306–313.
31. National Institutes of Health. Institutional administrator's manual for laboratory animal care and use. National NIH publication No. 88-2959 U.S. Department of Health and Human services, Bethesda, Maryland 20892, USA, revised in 1985.
32. Martínez-Vázquez, M.; Estrada-Reyes, R.; Martínez-Laurrabaquio, A.; López-Rubalcava, C.; Heinze, G. Neuropharmacological study of *Dracocephalum moldovica* L. (Lamiaceae) in mice: Sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *141*, 908–917.

*Sample Availability:* Samples of the Neoponcirin is available from the authors.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jep](http://www.elsevier.com/locate/jep)

Research Paper

## Central nervous system effects and chemical composition of two subspecies of *Agastache mexicana*; an ethnomedicine of Mexico



Rosa Estrada-Reyes<sup>a,\*</sup>, C. López-Rubalcava<sup>b</sup>, Octavio Alberto Ferreyra-Cruz<sup>a</sup>,  
Ana María Dorantes-Barrón<sup>a</sup>, G. Heinze<sup>c</sup>, Julia Moreno Aguilar<sup>a</sup>,  
Mariano Martínez-Vázquez<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Fitofarmacología, Dirección de Investigaciones en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Calzada México Xochimilco 101, Sn. Lorenzo Huipulco, México, D.F. 14370, México

<sup>b</sup> Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Calzada de los Tenorios 235, Col Granjas Coapa CP, 14330 México, D.F., Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Psiquiatría y Salud Mental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Edificio F s/n, Circuito Interior y Cerro del Agua, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F. 04510, Mexico

<sup>d</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México, D.F., Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 October 2013

Received in revised form

13 December 2013

Accepted 31 December 2013

Available online 21 January 2014

#### Keywords:

Toronjil morado

Toronjil blanco

*Agastache mexicana* spp. *Mexicana**Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana*

Anxiety

Cultural affiliation syndromes

### ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** *Agastache mexicana* subspecies *mexicana* (Amm) and *xolocotziana* (Amx) are used in Mexican traditional medicine to relief cultural affiliation syndromes known as "susto" or "espanto", for "nervous" condition, and as a sleep aid. Despite its intensive use, neuropharmacological studies are scarce, and the chemical composition of the aqueous extracts has not been described. **Aims of the study** are: (1) To analyze the chemical composition of aqueous extracts from aerial parts of Amm and Amx. (2) To evaluate the anxiolytic-like, sedative, antidepressant-like effects. (3) Analyze the general toxic effects of different doses.

**Materials and methods:** Anxiolytic-like and sedative effects were measured in the avoidance exploratory behavior, burying behavior and the hole-board tests. The antidepressant-like actions were studied in the forced swimming and tail suspension tests. Finally, general activity and motor coordination disturbances were evaluated in the open field, inverted screen and rota-rod tests. The acute toxicity of Amm and Amx was determined by calculating their LD<sub>50</sub> (mean lethal dose). The chemical analyses were performed employing chromatographic, photometric and HPLC-ESI-MS techniques.

**Results:** Low doses of Amm and Amx (0.1 σ 1.0 mg/kg) induced anxiolytic-like actions; while higher doses (over 10 mg/kg) induced sedation and reduced the locomotor activity, exerting a general inhibition in the central nervous system (CNS).

**Conclusions:** Results support the use of Amm and Amx in traditional medicine as tranquilizers and sleep inducers. Additionally, this paper contributes to the knowledge of the chemical composition of the aqueous extracts of these plants.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The *Agastache* genus (Lamiaceae) consists of 112 species that are distinguished by being aromatic, herbaceous and perennial plants. Most plants from this genus grow wild in Southeast Asia and North America and 12 of these species are endemic to Mexico (Lint and Epling, 1945; Sanders, 1987; Rzedowski and Calderon, 2001; Martínez-Gordillo et al., 2013). In central Mexico, the *Agastache mexicana* species is a traditional therapeutic resource (Santillán-Ramírez et al., 2008) and perhaps, due to its huge marketing and extensive use in current Mexican traditional medicine it is considered as one of the most important species

of the genus *Agastache* (Estado de la información forestal de México, 2002).

Two subspecies of *A. mexicana* have been proposed based on botanical and chemical studies; these are recognized as *A. mexicana* subsp. *mexicana* and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana* (H.B.K.) Lint & Epling subsp. *mexicana* Bye, Linares & Ramamoorthy (Bye et al., 1987; Linares et al., 1988, 1995; 1999; Estrada-Reyes et al., 2004).

Actually, a recent study about ethnobotany and vegetative anatomy also supports the classification of *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* and *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* as different entities (Santillán-Ramírez et al., 2008). These two subspecies are phenotypically distinguished by the shape of the leaves, the color of the flowers, and their flavor; however, there are not usage preferences between them among the population (Santillán-Ramírez et al., 2008).

\* Corresponding author.



*A. mexicana* ssp *mexicana* is popularly known as “toronjil morado” or “toronjil de casa” (purple or red hyssop, or home’s hyssop) whilst *A. mexicana* ssp *xolocotziana* is known as “toronjil blanco” (white hyssop). At the state of Puebla, México; the Otomí ethnía recognizes the two subspecies as “tama”, “toroji”, and/or “toronjil”. The Tepehua’s native culture of Veracruz, Hidalgo and Puebla states, also knows the two subspecies as “pinkil” (Diccionario enciclopédico de la medicina tradicional mexicana, 2009). This community usually consumes the aqueous infusions prepared with 6 g of the leaves of these plants after every meal to induce sleep, as a sedative and nervous relaxant, and moreover they use these plants to relieve digestive problems and menstrual cramps (Zamora and Barquín, 1997; Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Mexico, 2010).

Besides *Agastache mexicana* species, several other medicinal plants are also known under the common denomination of “toronjil”, such as *Dracocephalum moldavica* “toronjil azul” (blue hyssop or foreign hyssop), *Cedronella mexicana* “toronjil” (hyssop), *Clinopodium mexicanum* “toronjil de monte” (mount hyssop) and “toronjil” *Melissa officinalis* (Aguilar et al., 1994a, 1994b; Estrada-Reyes et al., 2010a; Martínez-Vázquez et al., 2012a).

The uses of the *A. mexicana* species have varied on time. For example, infusions of purple hyssop have been employed since pre-Hispanic time as a wound-healing remedy, as well as an antispasmodic agent and against stomachache while; teas and infusions of white hyssop have been used to treat heart illness (Argueta et al., 1994; De la Cruz-Badiano, 1991). However, nowadays both subspecies are employed without distinction to relieve nervous disorders, for the strong impressions overcoming, as well as tranquilizer agents (Villavicencio et al., 2002; Tortoriello and Romero, 1992). Also, they are used as sleep aids due to their sedative properties and for the relief of the cultural affiliation syndromes or culture-bounded syndrome known as “susto” or “espanto” (fear or shock), conditions that include physical aspects and express elements of the culture. “Susto” is a frequent psychosomatic expression in traditional rural and even urban communities in Mexico, it is also called “espanto”. In this case, the “espanto” is a variant known around the world as the soul-loss phenomenon, but in Mexico and Latin America (in the popular media) takes a very particular character since it is considered a disease. “Susto” is often translated as “fright” or “soul-loss”. It is thought to occur when an individual is suddenly frightened or startled, placing the individual on a spiritually weakened state, causing a separation of body and soul. Symptoms can include weakness, listlessness, loss of appetite, fever, sadness, headaches and nightmares. Treatment for “susto” can vary and can be administered by family members or healers through healing rituals, invoking to benign spirits and praying for the return of lost soul and by the intake of herbal infusions in order to recover sleep and the tranquility (Zolla et al., 1998; Fernández et al., 2001; Extra-farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 2001; Smith et al., 2009).

Even though the scientific information about the medicinal properties of these plants is still scarce, the two subspecies of hyssop, purple and white, are currently commercialized in almost every medicinal plants market in Mexico. To our knowledge there is only one study about some pharmacological properties of *A. mexicana* available, and suggests that an aqueous preparation might produce anxiogenic-like actions in male rats; however, it does not reported that which subspecies of *A. mexicana* was studied (Molina-Hernández et al., 2000). Furthermore, there are no reports about the chemical composition of the aqueous preparations of these *A. mexicana* species, which are similar to the infusions employed in traditional medicine.

Chemosystematics studies of the *Agastache* species used in the traditional medicine reveal the frequent occurrence of flavonoids and flavonoid glycosides compounds. Since it is very well known that some flavonoids compounds can act on the central nervous

system (CNS) (Marder et al., 2003; Fernández et al., 2004; Estrada-Reyes et al., 2012), the presence of this type of compounds in the *Agastache* species could be related with their therapeutic effects (Estrada-Reyes et al., 2004).

In order to contribute to the knowledge of the pharmacological properties of *A. mexicana* subsp. *mexicana* and subsp. *xolocotziana* we aimed to investigate the CNS effects of their aqueous extracts in behavioral models of anxiety, depression, and sedation in mice. Additionally, the motor toxicity effects of these subspecies were evaluated in the open field, inverted screen and rota-rod tests. The acute toxicity was established by calculating the mean lethal dose (DL<sub>50</sub>) through an oral administration. To determine and compare the chemical composition of both *A. mexicana* subsp. *mexicana* and subsp. *xolocotziana*, the aqueous extracts of these subspecies were analyzed using a high performance liquid chromatography-electro spray ions-mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) method. Moreover, the total content of flavonoids and polyphenols was calculated with spectrophotometric methods and the presence of sugars, tannins, alkaloids, sterols and triterpenes compounds was tested by a chemical screening.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

*A. mexicana* subsp. *mexicana* and subsp. *xolocotziana* were collected in San José Tlacotitlán, Ozumba, Estado de Mexico, Mexico. The botanical identification was carried out by Dr. Robert Bye (*A. mexicana* subsp. *mexicana*, Voucher No. 1120 and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana* Voucher No. 1121) and samples of each plant were deposited at the National Herbarium of the Instituto de Biología, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### 2.2. Preparation of the aqueous extracts of *A. mexicana* subsp. *mexicana* (Amm) and subsp. *xolocotziana* (Amx)

The aerial parts of *A. mexicana* subsp. *mexicana* and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana* were air-dried and finely ground; afterwards, the respective aqueous extracts were prepared at a ratio of 10 g of vegetal material per 90 mL of boiling distilled water and heated over 10 min. The resulting extracts were allowed to cool at room temperature and were dried in a freezer dryer Telstar, at  $-50^{\circ}\text{C}$  and 0.01 mBar, yielding 1.54 g of dried aqueous extract of Amm and 1.75 g of dried aqueous extract of Amx. The extracts were stored at  $-4^{\circ}\text{C}$  until the pharmacological assays were performed.

### 2.3. Chemical analysis of aqueous extracts

The crude aqueous extracts were analyzed by HPLC using a millennium chromatography manager (464) system, with a UV-vs detector. Reversed-phase separation was carried out at room temperature, using a  $\mu$ Bondapak, C<sub>18</sub> column of 5.5 cm  $\times$  7 mm I.D., and a size particle of 10  $\mu\text{m}$ . The column was eluted at flow-rates of 1.0 mL/min at room temperature ranging from 0.6 to 1 mL/min in a gradient mode, with mixtures acetic acid (1%) water (15 min) to methanol-water (acetic acid 1%); the HPLC elution was monitored at 254 nm. Aliquots of 1 mg of extract were dissolved in 1 mL of distilled water, the samples were filtered through a 0.45- $\mu\text{m}$  filter and 10  $\mu\text{L}$  was injected in the HPLC system. Acacetin (1), apigenin (2), salvigenin (3), pilosin (4), 8-OH salvigenin (5), luteolin (6), acacetin 7-O- $\beta$ -D-glucoside (7), acacetin 7-O- $\beta$ -D-(2'-O-acetyl)-glucoside (8), acacetin 7-O- $\beta$ -D-(3'-O-acetyl)-glucoside, and acacetin 7-O- $\beta$ -D-(6'-O-malonyl)-glucoside (9) were previously isolated from organic extracts of the aerial parts of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* and subsp.



*xolocotziana* and these served as flavonoid standard (Petar et al., 2001; Estrada-Reyes et al., 2004). The identity and purity of the isolated products were confirmed by their physical and chemical properties as well as by their spectral data (IR, NMR <sup>1</sup>H, NMR <sup>13</sup>C, and MS).

The compounds of the active extract were identified and quantified by comparing their retention time (RT), HPLC peak, and M<sup>+</sup>, with the flavonoid standard. The HPLC peak areas were not corrected for response factors and are reported as the relative percentage of the area.

#### 2.4. Total phenolic content in Amm and Amx

The total phenolic content of both Amm and Amx was determined by the Folin–Ciocalteu method; data from the phenolic content of the dry aqueous extracts were expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per 100 g dry mass of Amm or Amx. (Rizner et al., 2000)

#### 2.5. Total flavonoids content in Amm and Amx

An aliquot of 0.01 g of Amm or Amx was used to determine the flavonoids content by the spectrometric technique described in the Brazilian Pharmacopeia (2002). The analyses were made in a spectrophotometer Bio Mate 3 (Thermo Electron, Corporation, USA). Only the mean values from three determinations, with acceptable coefficient of variation (less than 5%) were taken into account (Martínez-Vázquez et al., 2012a). Additionally, the Amm and Amx extracts were tested for saponins, alkaloids, tannins, and sterol compounds. Sugars were detected in TLC using specific chemical revelators for their identification by comparison with standard saccharides.

#### 2.6. Pharmacological evaluations

##### 2.6.1. Animals

Adult male Swiss Webster mice (25–30 g) were obtained from the vivarium at the National Institute of Psychiatry, Ramón de la Fuente Muñiz and housed 8 mice per cage in a room with an inverted light:dark cycle (12:12 h, lights on at 22:00 h) and with free access to water and commercial rat chow (Purina rodent laboratory mice chow 5001). All behavioral evaluations were done between 10:00 and 14:00 h. Animal care was performed in accordance to the general principles of laboratory animal care (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH publication No. 85-23, revised in 1985) and to the 'Norma Oficial Mexicana' (NOM-062-ZOO-1999). The experimental protocol was approved by the local ethical committee (NC093620.0).

##### 2.6.2. Drugs

All drugs in this study were administered in a total volume of 10.0 ml/kg body weight. The fresh aqueous extracts of Amm and Amx were dissolved in an isotonic solution (0.9% NaCl) and administered by oral route. Control animals received the same volume of vehicle (isotonic solution, 0.9% NaCl) also by oral route. Desipramine (DIM) and fluoxetine (FLX) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) were dissolved in an isotonic solution (0.9% NaCl), while diazepam (DZ; Hoffmann-La Roche, Mexico City, Mexico) was dissolved in a solution of 1.0% propylene glycol 100 (Pg), and DIM, FLX, and DZ were administered intraperitoneally.

#### 2.7. Animal models of anxiety

##### 2.7.1. Avoidance exploratory behavior test (AEBT)

This model was proposed for the study of new anxiolytic drugs and consisted of an acrylic chamber (44 × 21 × 21 cm) divided into

a small (one-third of the cage), darkened compartment and a large (two-thirds of the cage) and highly illuminated compartment (light intensity 560 lx). An opening of 13 × 15 cm separated the dark from the bright area. At the beginning of the test, each mouse was introduced into the bright compartment and the number of transitions from one side to the other was recorded for 10 min, also the time that animals spent in the illuminated area was registered. Increases in these parameters were interpreted as anxiolytic-like effects (Crawley and Goodwin, 1980; Crawley and Davis, 1982; López-Rubalcava et al., 1992).

The test chamber was carefully cleaned after each test. In order to prevent animals' behavioral changes after the first experience, mice were tested only once in this paradigm. Mice were assigned to a dose group ( $n=12$ ) and received one of the following treatments: Amm (0.01, 0.1, 1.0, 10.0, and 100 mg/kg, –60 min), Amx (0.1, 1.0, 10.0, and 100 mg/kg, –60 min) or diazepam (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mg/kg, –30 min) that was used as a positive control group. All experimental sessions were videotaped and later registered by an observer that was unaware of the pharmacological treatments.

##### 2.7.2. Burying behavior test (BBT)

Mice were individually placed in an acrylic cage (15 × 24 × 11) that had an electrified prod (7 cm long) emerging from one of its walls, 2 cm above the bedding material consisting of fine sawdust. The prod was connected to a constant current shocker (La Fayette Instruments Co., model 5806), and when the animal touched the prod it received an electric shock of 0.3 mA. The prod remained electrified throughout the test. Immediately after introducing the animal in the cage, its behavior was video-recorded for 10 min. The parameters registered were the cumulative burying behavior (cumulative time, in seconds, that the animals spend burying the prod) and burying behavior latency (time in seconds from the first shock to the burying behavior display). A decrease in the cumulative time of burying behavior is interpreted as a reduction in anxiety (Pinel and Treit, 1978; Treit, 1985), while an increase in burying behavior latency indicates a decrease in animals' reactivity (the readiness of the animal to respond to a certain condition) (Rodríguez-Manzo et al., 1999; López-Rubalcava et al., 2009).

Mice were divided into groups ( $n=12$ ) and received one of the following treatments: Amm (0.01, 0.1, 1.0, 10.0 or 100 mg/kg, –60 min), Amx (0.1, 1.0, 10.0 or 100 mg/kg, –60 min) or diazepam (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 or 4.0 mg/kg, –30 min). All mice were tested only once in this paradigm. All experiments were registered by an observer who was unaware of the pharmacological treatments.

#### 2.8. Animal model for sedation

##### 2.8.1. Hole-board test (HBT)

The hole-board apparatus is a wooden box of 60 × 30 × 15 cm, with four equidistant holes (1 cm diameter) on the floor. Mice were placed at the center of the hole-board, and the numbers of head-dips into the holes, as well as the number of rearings (when a mouse stands up on its hind legs) were evaluated over a 5 min period. The animals were tested in a randomized order with respect to drug treatment between 9:00 a.m. and 14:00 p.m. in a room lit by dim light. Mice were randomly allocated to one of the following groups: vehicle control, Amm (1, 10, 50, 100 or 200 mg/kg, –60 min), Amx (1, 10, 50, 100 or 200 mg/kg) or diazepam (0.5, 1, 2 or 4 mg/kg). After each trial, the floor of the apparatus was carefully cleaned, with a tissue to remove traces of previous tests. A decrease in the number of head dipping, the time of head dipping, and the number of rearings relative to the control group reveal a sedative action, while an increase in these same variable is considered as an anxiolytic-like effect (Marder et al., 2003).



## 2.9. Animal models of depression

### 2.9.1. Tail suspension test (TST)

Acoustically and visually isolated mice were suspended 50 cm above the surface of a wooden box by adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail. Each mouse was suspended over a total of 6 min, and the duration of immobility was recorded during the final 4 min interval of the test. In this test, immobility behavior is considered only when the mouse remains passively hung and completely motionless.

Animals were divided into eight independent groups ( $n=8$  per group) that received Amm or Amx (1.0, 10, 100, or 200 mg/kg –60 min). Vehicle-treated group ( $n=8$ ) served as controls. Results from Amm and Amx were compared with DIM (12.5 or 25 mg/kg, –30 min) (McArthur and Borsini, 2006; Machado et al., 2007, 2008).

### 2.9.2. Forced swimming test (FST)

Mice were individually placed into glass cylinders (height: 21 cm, diameter: 14.5 cm) containing 15 cm of water at  $23 \pm 1$  °C. All animals were forced to swim for a 15 min period (pre-test), followed by a 5 min session (test) 24 h later. The total immobility time was measured in seconds. The immobility behavior was considered when mice remain floating and treading on the water just enough to keep the nose above water. After the swimming sessions, mice were removed from the cylinder and carefully dried, placed in heated cages for 20 min and then returned to their home cages. All experimental sessions were videotaped and later registered by an observer who was unaware of the pharmacological treatments (Porsolt et al., 1977a, 1977b; Martínez-Vázquez et al., 2012a, 2012b).

In this test, four independent groups of eight animals received 1.0, 10, 100, or 200 mg/kg doses of Amm 60 min before the test. Amx was administered at the same doses and with the same time schedule as Amm. A vehicle-treated group served as a control. Two independent groups treated with DIM (25 and 50 mg/kg dose) served as positive control and were administered 30 min before the test.

## 2.10. Motor toxicity tests

In order to evaluate possible toxic effects of drug-treatments, the effects of Amm and Amx on locomotor activity were analyzed in the Open Field Test, while the Inverted Screen Test was used to measure hind-limb strength and muscle tone or myorelaxation. Finally, mice motor coordination was studied in the rota-rod test. The LD<sub>50</sub> to Amm and Amx was determined by Lorke's method.

### 2.10.1. Open field test (OFT)

In order to discard unspecific actions of Amm and Amx on locomotor activity, all studied treatments in the anxiety paradigms were analyzed in the open field test. Motor activity was measured in an apparatus consisting of an opaque-plexiglas box (40 × 30 × 20 cm), divided into 12 equal squares (11 × 11 cm). The animal was placed in a corner of the cage, and its behavior was videotaped over a 5-min period. An observer, who was blind to the pharmacological treatments, registered the total number of times (counts) the animal crossed a square during the test. A count was considered when the animal totally crossed from one square to the next. A decrease in the number of counts was considered as a decrease in locomotor activity. The test box was carefully cleaned after each session. To prevent behavioral changes of the animals after the first experience, mice were tested only once.

### 2.10.2. Rota-rod test

Pre-selected mice (animals that stayed for at least 10 min on the rotating bar, 24 h before testing) were placed on the horizontal rotating bar of the rota-rod apparatus, 1 h after Amm or Amx (1.0, 10, 50, 100, and 200 mg/kg) or 30 min after DZ (2 and 4 mg/kg) treatments. The apparatus was carefully cleaned after each trial. The latency time to the first fall was recorded. A decrease in the time that animals remain mounted on the rota-rod with respect to the control group was considered as an impairment in motor coordination (Nwinyi and Kwanashie, 2009; Martínez-Vázquez et al., 2012a).

### 2.10.3. Inverted screen test (IST)

Each mouse was placed in the center of a screen (30 cm<sup>2</sup> square-wire mesh, 25-mm<sup>2</sup> holes), and the screen was inverted over a 2-s period with the mouse's head declining. The screen was held steadily 30 cm above a solid, cushioned surface. Latency to falling from the screen was noted, with a 120 s time limit for each trial. The percentage of time spent upside down on the screen was recorded, and this was considered as an indicator of hind-limb strength motor activity levels of mice (Mylvaganam et al., 1999).

### 2.11. Determination of acute toxicity of *A. mexicana* subsp *mexicana* and *A. mexicana* subsp *xolocotziana* (LD<sub>50</sub>)

The LD<sub>50</sub> of Amm and Amx was determined after an oral administration in accordance to Lorke et al.'s (1983) method.

Briefly, in the first stage, the aqueous extracts (10, 100, and 1000 mg/kg) were orally administered to three groups of three mice each. The animals were observed for 1 h for signs and symptoms of toxicity. Later observations were made every 24 h for 7 days. In the second phase, doses of 1000, 1600, 2900, and 5000 mg/kg were administered to four groups of one, three, four, and five animals, respectively. These mice were carefully observed until their total recovery or death. To record total mortality, the surviving animals were observed for 14 days.

## 2.12. Statistical analysis

Data that met criteria of normality (Kolmogorov–Smirnov test) and variance equality were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA). Dunnett's test for multiple comparisons vs control group was applied when the ANOVA showed significant difference;  $p$ -values <0.05 were considered to be statistically significant.

When data did not meet normality or variance equality criteria, a non-parametric analysis was employed. The differences between the treated and the control groups were analyzed using a Kruskal–Wallis analysis of variance on ranks ( $p^* < 0.05$ ,  $p^{**} < 0.01$ , and  $p^* < 0.001$ ), followed by the Mann–Whitney Rank Sum Test. All statistical analysis and graphics were carried out using the Sigma Stat and Sigma Plot Programs (version 3.5, and 10.0, respectively).

## 3. Results

As shown in Table 1, the aqueous extracts of both Amm and Amx had a similar profile in the HPLC–MS; however, regarding to the relative abundances of their constituents, these plant extracts showed important differences. For example, the acacetin 7-O- $\beta$ -glucoside is present in Amm (24.49%) and Amx (22.42%) at similar proportions, corresponding to 15.89  $\mu$ g per gram of extract of Amm and 12.81  $\mu$ g/g extract of Amx. While, the acacetin 7-O- $\beta$ -(6'-O-malonyl)-glucoside was the major constituent of subsp. *mexicana* present in a 31.47% (20.43  $\mu$ g/g extract), unlike the subsp. *xolocotziana*, which contains only a 2.21% (1.26  $\mu$ g/g



**Table 1**  
Components identified in aqueous extracts of *A. mexicana* ssp. *mexicana* and *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* by HPLC–MS technical.

Compound number	RT (min)	Compound name	[M+1]	Formulas	Abundance (%)	
					Amm	Amx
	2.56	Malic acid	135	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	0.30	–
1	13.4	Luteolin 7-O-β-D-glucoside	449	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	0.58	–
2	14.2	Luteolin 7-O-β-D-(6'-O-malonyl)-glucoside	535	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>14</sub>	15.22	–
3	14.5	Diosmetin 7-O-β-D-glucoside	463	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	–	5.14
4	15.8	Diosmetin 7-O-β-D-(6'-O-malonyl)-glucoside	549	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>14</sub>	13.95	32.9
5	16.8	Acacetin, 7-O-β-glucoside	447	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	24.49	22.42
6	17.6	Acacetin 7-O-β-D-(6'-O-malonyl)-glucoside	533	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>13</sub>	31.47	2.21
7	19.2	No identified	469	–	–	0.8
8	20.0	Acacetin-7-O-β-glucoside-D-(2''-acetyl-6''malonyl)	575	C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> O <sub>14</sub>	12.00	11.21
9	24.7	Acacetin	285	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	–	0.9
10	26.5	Diosmetin	301	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	0.2	0.6
11	27.5	Gardenin A+Na	441	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	0.25	0.4
12	27.9	5,6,7,8,3-Pentahydroxy, 4-methoxyflavone	333	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	0.19	0.2
13	28.7	8-Hydroxy-salvigenin	347	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	0.3	0.11
<b>Total</b>					98.95	78.89

extract). In contrast, the diosmetin 7-O-β-D-(6'-O-malonyl)-glucoside derivate was more abundant in Amx with 32.9% (21.35 μg/g extract), while in Amm its relative abundance was only 13.95% (7.96 μg/g extract). The luteolin flavone and its glucosylated derivate only were detected in the subsp. *mexicana*. Fig. 1 shows the flavonoid compound isolated from organic extracts and detected in the aqueous extracts of the subspecies *mexicana* and *xolocotziana*. Previously, we reported the chemical composition of organic extracts of *A. mexicana* subsp. *mexicana* and subsp. *xolocotziana* (Estrada-Reyes et al., 2004); in the present study, pilosin, 8-hydroxy-flavone and β-amirin were isolated for the first time as minor constituents of the non-polar extracts of *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*.

Total flavonoid content of Amm and Amx used quercetin as base calculation and expressed as percentage of average ± SEM was 54.4 ± 0.73% for Amm and 25.29 ± 0.49% for Amx.

Total polyphenols calculated by the Folin–Cicalteu method and expressed as average ± SEM of mg of gallic acid (GA) per g of dry extract were the following Amm = 320 ± 4.7 (mgGA/ grams of dry extract) and Amx = 162.3 ± 1.23 (mg GA/g of dry extract).

Finally, glucose, fructose, and the sucrose disaccharides were detected with a thin layer chromatography (TLC) analysis using α-naftol as a developer in Amm and Amx. Rhamnose was only detected in Amm, while both Amm and Amx tested positive for saponins and tannins, and negative for sterols, triterpenes, and alkaloids-type compounds.

### 3.1. Pharmacological evaluations

#### 3.1.1. Avoidance exploratory behavior test (AEBT)

The effects of Amm and Amx in the mouse "Avoidance Exploratory Behavior test" are shown in Fig. 2. As it can be observed, the administration of low doses of Amm (0.01, 0.1, 1.0 and 10), Amx (1 and 10 mg/kg) and diazepam (0.25 and 0.5) significantly increased the number of transitions between the dark and bright compartments (Fig. 2, left panel). However, no effect was observed in the number of transitions at high doses of Amm (100 mg/kg), Amx (100 mg/kg) or diazepam (1, 2 or 4 mg/kg). The effect of Amm, Amx and diazepam on the time that mice spent in the bright compartment is shown in Fig. 2 (right panel). In this case, also a significant increase in this parameter was observed after the administration of low doses of Amm (0.01, 0.1 and 1 mg/kg), Amx (1 mg/kg) or diazepam (0.25 and 0.5 mg/kg). Higher doses of these compounds had no effect in this parameter.

#### 3.1.2. Burying behavior test (BBT)

Fig. 3 shows the effect of the aqueous extracts of Amm, Amx and the classical anxiolytic compound diazepam in the cumulative time of burying behavior (left panel) and in the burying behavior latency (right panel). In this case, the doses of 10 and 100 mg/kg of Amm and Amx significantly decreased the burying behavior. This effect was similar to that induced with diazepam at the doses of 0.5, 1.0 and 2 mg/kg. Burying behavior latency was only increased with the administration of 100 mg/kg of Amm (Fig. 3, right panel).

#### 3.1.3. Hole-board test

Fig. 4 shows the anxiolytic and sedative effects of DZ (0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mg/kg), Amm and Amx (10, 50, 100, 200 mg/kg) in the hole-board test. The results shows that DZ induced dual effect in this test, at low doses (0.5 and 1.0 mg/kg) it produced a significant increase in the number of head dipping and rearings, while a decrease of these parameters was observed when the dose was increased to 2.0 and 4.0 mg/kg (head dipping:  $H=31.68$ ,  $df=4$ ,  $p \leq 0.001$  and rearing number:  $H=28.06$ ,  $df=4$ ;  $p \leq 0.001$ ). Amm and Amx induced a significant dose-dependent decrease in both behavioral responses; in the case of Amm, the effect was observed starting from 10 mg/kg (rearing number:  $H=29.0$ ,  $df=5$ ,  $p \leq 0.001$  and head dipping number:  $H=27.9$ ,  $df=5$ ,  $p \leq 0.001$ ). Likewise, Amx produced a decrease in these parameters; however, this plant extract showed depressant effects starting at 1.0 mg/kg (rearing number:  $H=42.21$ ,  $df=5$ ,  $p \leq 0.001$ , head dipping number: 39.70,  $df=5$ ,  $p \leq 0.001$ ).

#### 3.1.4. Effects of DIM, Amm, and Amx on the tail suspension test (TST)

As shown in Fig. 5A and B, DIM (12.5 or 25 mg/kg) decreased immobility time in the TST ( $F_{(2,21)}=88.94$ ,  $p < 0.001$ ). By contrast, increasing doses of both Amm and Amx induce helpless-like behavior observed as an increase in the immobility time ( $F_{(4,35)}=48.43$ ,  $p < 0.001$  for Amm, and a  $F_{(4,35)}=43.53$ ,  $p < 0.001$  for Amx), only at 100 mg/kg had no effect in this test.

#### 3.1.5. Forced swimming test (FST)

As shown in Fig. 5C, DIM (25 and 50 mg/kg) significantly decreased the immobility time ( $F_{(2,21)}=87.56$ ,  $p < 0.001$ ) in the FST; while the oral treatment of Amm produced a significant increase in immobility time from the dose of 1 to 100 mg/kg ( $F_{(4,35)}=20.26$ ,  $p \leq 0.001$ ) (Fig. 5D). Contrary to this, treatment with Amx (1, 10, 100, and

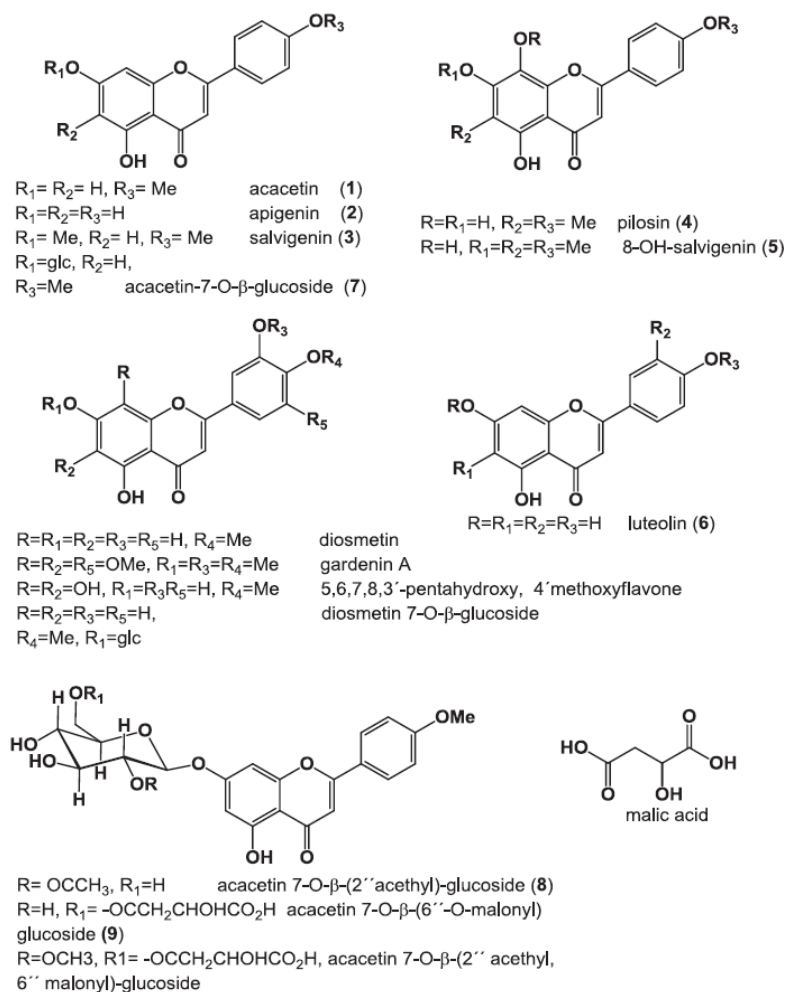


Fig. 1. Main constituent of aqueous extracts of *A. mexicana* subsp. *mexicana* and subsp. *xolocotziana* identified by HPLC-MS technical.

200 mg/kg) did not produced significant changes in immobility time with respect to the control group, only the highest dose (200 mg/kg) produced a significant increase in immobility time ( $F_{(4,35)}=6.41, p \leq 0.001$ ).

### 3.2. Motor toxicity tests

#### 3.2.1. Open field test (OFT)

The effects of different treatments of diazepam, Amm and Amx on the open field test are shown in Table 2. It can be observed that only the high doses of Amm (100 mg/kg), Amx (100 mg/kg) and diazepam (4 mg/kg) induced a significant decrease in general activity of mice tested in the open field test.

#### 3.2.2. Rota-rod test

Low doses of Amm and Amx (from 0.01 to 10 mg/kg) had no effect on the motor coordination of mice tested in the Rota-rod

test, while high doses (from 100 to 1000 mg/kg) dose dependently decreased it. In this case, the effects produced by Amm on motor coordination were greater than those induced by Amx. Similarly, Dz decreased motor coordination at 20 and 4.0 mg/kg (see Table 2).

#### 3.2.3. Inverted screen test

As shown in Table 2, both Amm and Amx significantly reduced the activity and strength of mice subjected to the inverted screen test. This effect was observed by a decrease on the percentage of time that animal's staid upside down on the screen. Amm and Amx, at the dose of 1000 mg/kg, decreased this time to 25.22% and 22.64% respectively. It is important to mention that Amm (100 mg/kg) produced a significant increase in the percentage of time; this response was not observed with none of the doses tested of Amx. On the other hand, only the high dose of diazepam (4.0 mg/kg) tested in the inverted screen significantly reduced the percentage of time.

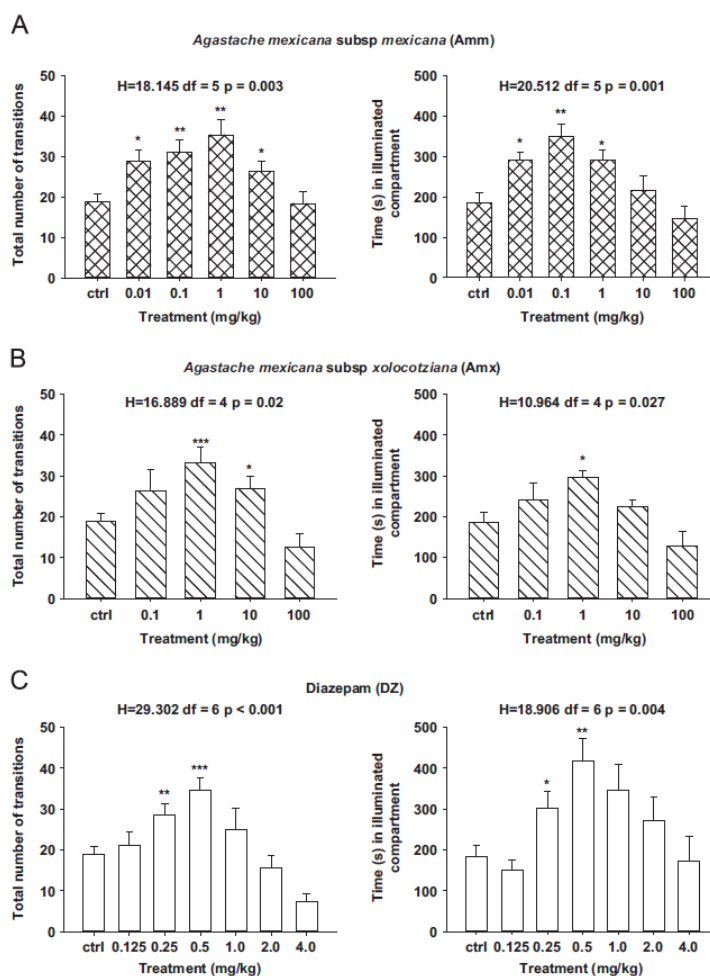


Fig. 2. Effects of Amm, Amx and DZ on the AEBT. (A) Amm vs control group, the total number of transitions:  $H=18.14$ ,  $df=5$ ,  $p=0.003$ . Amm vs control group, time in illuminated compartment:  $H=20.51$ ,  $df=5$ ,  $p=0.001$ . (B) Amx vs control group, the total number of transitions:  $H=16.88$ ,  $df=4$ ,  $p=0.02$ . Amx vs control group, time in illuminated compartment:  $H=10.96$ ,  $df=4$ ,  $p=0.027$ . (C) DZ vs control group, the total number of transitions:  $H=29.30$ ,  $df=6$ ,  $p<0.001$ . DZ vs control group, time in illuminated compartment:  $H=18.90$ ,  $df=6$ ,  $p=0.004$ .

### 3.3. Acute toxicity of *A. mexicana* subsp *mexicana* and *A. mexicana* subsp *xolocotziana* ( $LD_{50}$ )

According to Lorke's classification, Amm was not toxic when it was orally administrated, having a  $LD_{50} > 5000$  mg/kg. At doses above 2600 mg/kg, some adverse effects, such as diarrhea, rash and ataxia, were seen approximately 50 min after administration, these manifestations persisted for 1–2 h after the treatment. However, after 3 h, these effects disappeared and the animals went back to their usual behavior.

Amx was slightly more toxic than Amm, with an  $LD_{50} = 3807$  mg/kg dose. When the animals were orally administrated with 2900 mg/kg of Amx some toxic manifestations were observed; the animals were lying down and quiet, whereupon diarrhea and diaphoresis were observed, until their total recuperation within the next 2 h. The animal group that was treated with 5000 mg/kg of Amx showed toxic manifestations that lasted until death of 100% of experimental animals.

### 4. Discussion

As mentioned above, *Agastache mexicana* is used in tea or infusions, as an herbal remedy for the cure of fright or "susto", for its sedative effects to induce sleep, and as a tranquilizer, and. This medicinal plant nowadays is one of the best-selling herb remedies in central Mexico. However, to our knowledge there are no reports that confirm the effects attributed to the specie *Agastache mexicana*; moreover, the existence of two different subspecies of *A. mexicana* used for the same purposes has not been previously considered.

Considering this, the aim of the present study has two aspects, first to evaluate the CNS effects produced by the aqueous extract of aerial parts of *A. mexicana* subsp *mexicana* and subsp *xolocotziana* in several behavioral models and to provide information about the chemical composition of both aqueous extracts of which there is no available information.

Considering the chemical composition, the HPLC–MS analysis of the aqueous extracts of both subspecies revealed the presence of



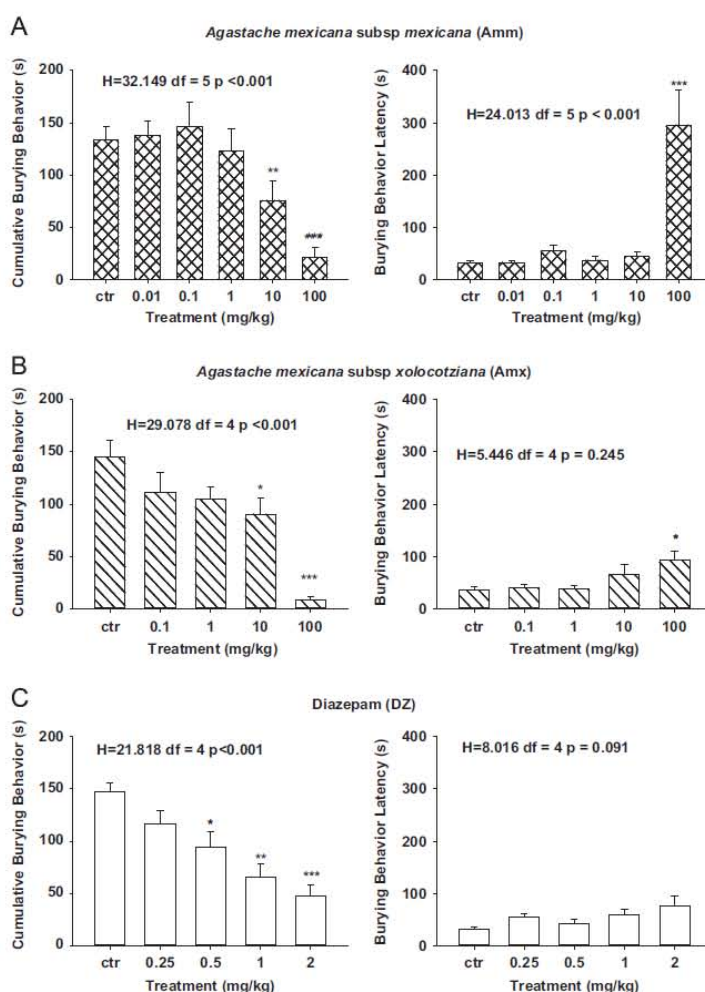
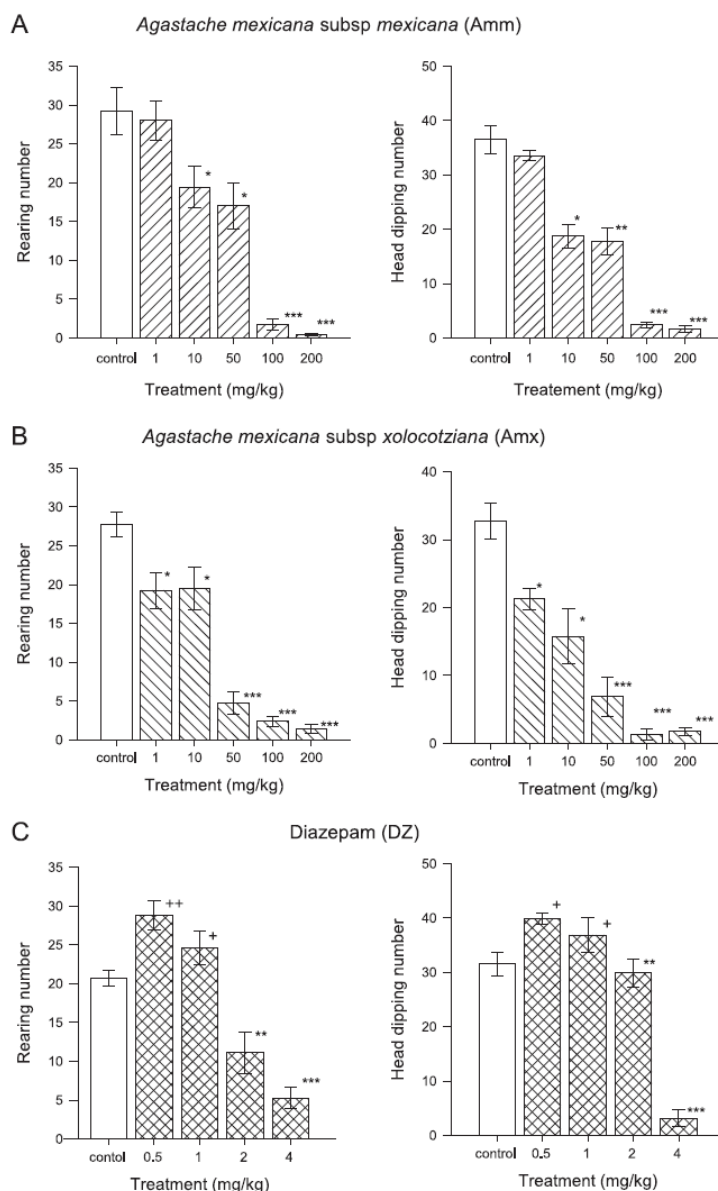


Fig. 3. The effects of Amm, Amx, and Dz on the burying behavior test. Cumulative burying behavior (CBB) and burying behavior latency (BBL). Results are expressed as the average  $\pm$  s.e.m. Results are expressed as average  $\pm$  s.e.m. Statistical comparisons were made using a Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks, followed by the Mann–Whitney rank sum test ( $p^* < 0.05$ ,  $p^{**} < 0.01$ ,  $p^{***} < 0.001$ ). (A) Amm vs control group, cumulative burying behavior:  $H = 32.14$ ,  $df = 5$ ,  $p \leq 0.001$ . Amm vs control group, burying behavior latency:  $H = 24.013$ ,  $df = 5$ ,  $p \leq 0.001$ . (B) Amx vs control group, cumulative burying behavior:  $H = 29.07$ ,  $df = 4$ ,  $p \leq 0.001$ . Amx vs control group, burying behavior latency:  $H = 5.44$ ,  $df = 4$ ,  $p = 0.24$ . (C) Dz vs control group, cumulative burying behavior:  $H = 21.818$ ,  $df = 4$ ,  $p \leq 0.001$ . Dz vs control group, burying behavior latency:  $H = 8.01$ ,  $df = 4$ ,  $p \leq 0.001$ .

non-polar flavonoid aglycones; diosmetin, gardenin A, and 8-OH-salvigenin in trace amounts as would be expected. The known flavonoid glycoside, acacetin-7-O- $\beta$ -glucoside (15.89  $\mu\text{g/g} = 24.49\%$  in Amm and 12.81  $\mu\text{g/g} = 22.42\%$  in Amx), was detected as the main product. Also, its corresponding malonyl derivative, the acacetin 7-O- $\beta$ -D-(6'-O-malonyl)-glucoside (9) and diosmetin 7-O- $\beta$ -D-(6'-O-malonyl)-glucoside were detected, but important difference in terms of concentration was observed between both subspecies (acacetin 7-O- $\beta$ -D-(6'-O-malonyl)-glucoside: Amm=20.43  $\mu\text{g/g}$  and Amx=1.26  $\mu\text{g/g}$  and diosmetin 7-O- $\beta$ -D-(6'-O-malonyl)-glucoside: Amm=7.96  $\mu\text{g/g}$  and Amx=21.35  $\mu\text{g/g}$ ). In this regard, researches on the biosynthesis of flavone conjugated in cell cultures have suggested that malonylation may be the final step in the formation of these

glycosyl plant constituents. This is due to the actions of malonyl-transferases which could fulfill an important function; because malonylation renders more water soluble glycosyl compounds that are more suitable to be stored in plants' vacuoles. However, the presence of malonyl-glucoside in polar extracts has been scarcely described due to the fact that these labile esters are generally overlooked because of inadequate isolation and detection procedures which cause their degradation. As mentioned in Results section, the malic acid was also isolated by precipitation of the aqueous extract from the sub-specie *mexicana* and was detected by HPLC–MS analysis. These last results, together with sugars concentrations in Amm, could explain the high concentration of malonyl glucosylated derivative observed in Amm.



**Fig. 4.** Effects of Amm, Amx and DZ on the hole-board test of all the results were expressed as the average  $\pm$  s.e.m. of groups of eight animals each. Comparisons were made by using a Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks, followed by Mann–Whitney rank sum U-test: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (significantly decreased) + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$  (significantly increased). (A) Amm vs control group, rearing number:  $H=29.0$ ,  $df=5$ ,  $p \leq 0.001$ . Amm vs control group, head dipping number:  $H=27.9$ ,  $df=5$ ,  $p \leq 0.001$ . (B) Amx vs control group, rearing number:  $H=42.21$ ,  $df=5$ ,  $p \leq 0.001$ . Amx vs control group, head dipping number:  $H=39.70$ ,  $df=5$ ,  $p \leq 0.001$ . (C) DZ vs control group, rearing number:  $H=28.06$ ,  $df=4$ ,  $p \leq 0.001$ . DZ vs control group, head dipping number:  $H=27.9$ ,  $df=5$ ,  $p \leq 0.001$ .

Other remarkable difference between Amm and Amx is the total abundance of polyphenols and flavonoids. Amm contains a large concentration of polyphenols and total flavonoids as compared to Amx. This is probably related to the intense red to blue color of the sub-specie *mexicana*.

Certainly, the differences found in the chemical composition of both extracts could modify their metabolism and bioavailability,

and therefore their pharmacological effects. However, it is necessary to make future studies concerning this issue.

On the other hand, the chemical composition of the organic extracts from these plants was previously reported by our group (Estrada-Reyes, et al., 2004) (see Fig. 1). In the present work pilosin (Fig. 1, structure number 4); an 8-hydroxy-flavone and  $\beta$ -aminin were isolated as minor constituents from hexane extract of



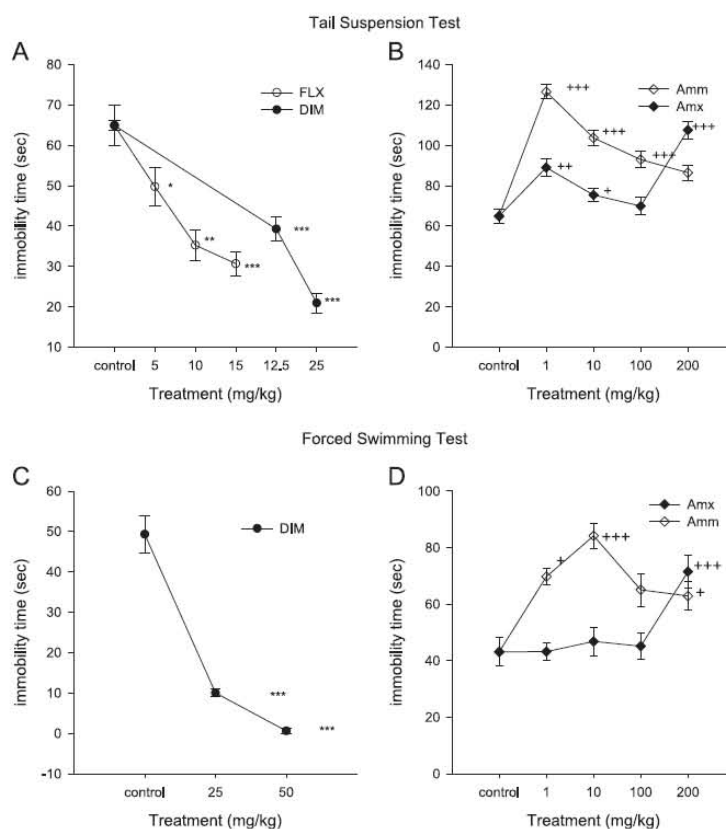


Fig. 5. Antidepressant-like effects of FLX, DIM, Amm and Amx on the tail suspension and the forced swimming tests. Tail suspension test. (A) DIM vs control group:  $F(2,21)=88.94$ ,  $p < 0.001$  (Desipramine=DIM; ●). FLX vs control group:  $F(3,56)=27.52$ ,  $p < 0.0001$  (fluoxetine= FLX; ○). (B) Amm vs control group:  $F(4,35)=48.43$ ,  $p < 0.0001$  (*A. mexicana* subsp. *mexicana*=Amm; ◊). Amx vs control group:  $F(4, 35)=43.53$ ,  $p < 0.001$  (*A. mexicana* subsp. *xolocotziana*=Amx, ●). Forced swimming test. (C) DIM vs control group:  $F(2,21)=87.56$ ,  $p < 0.001$  (Desipramine=DIM, ●). (D) Amm vs control group:  $F(4,35)=20.26$ ,  $p < 0.001$  (Amm=◊) and Amx vs control group:  $F(4,35)=6.41$ ,  $p < 0.001$  (Amx ●). Data are expressed as the average  $\pm$  s.e.m. of eight animals, ANOVA was increased in the immobility time \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , decreased in the immobility time + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$ , +++ $p < 0.001$ , followed by Dunnett's test.

*A. mexicana* subsp. *xolocotziana*. To our knowledge, this flavone has not been previously reported from this specie, furthermore 8-hydroxylated derivatives including 8-OH salvigenin (Figs. 1–5), which is closely related to pilosin, have been reported from other not very frequent species of the *Agastache* genus (Jamzad et al., 2003).

Regarding the pharmacological evaluations in the present study, the "Avoidance Exploratory Behavior" and the "Burying behavior" tests were used to detect putative anxiolytic-like actions of the aqueous extracts of Amm and Amx. In the first paradigm, an increase in the number of transitions between the bright and dark compartments is regarded as an index of anxiolytic activity, while a decrease in this parameter is considered as an anxiogenic-like effect (Bourin and Hascoët, 2003).

In the present study, low doses of the aqueous extracts of Amm and Amx induced anxiolytic-like actions by significantly increasing the number of transitions between the bright and dark compartments. These effects were similar to those induced by the administration of low doses of the classic anxiolytic diazepam (López-Rubalcava et al., 2006). These three compounds (at the same dose) also increased the time that mice spent in the bright area. An increase in this parameter also denotes anxiolytic-like actions,

which confirms the anxiolytic-like actions of Amm and Amx. In this case Amm seems to be more potent than Amx, because lower doses of Amm (0.01–10.0 mg/kg) induce anxiolytic-like actions in comparison to Amx that needs higher doses (1.0 to 10 mg/kg). When mice were tested with high doses of Amm (100 mg/kg), Amx (100 mg/kg) or diazepam (4.0 mg/kg) no significant effects were observed in the number of transitions or in the time spent in the bright compartment. These results could be due to unspecific actions of the drugs, with the same doses, Amm, Amx and diazepam decreased general activity in the open field test and produced motor incoordination in the rota-rod test.

Results obtained in the burying behavior test showed that Amm and Amx (10 and 100 mg/kg) as well as diazepam (0.5 to 2.0 mg/kg) decreased burying behavior, an effect considered as an anxiolytic-like action (Treit, 1985; López-Rubalcava et al., 2009). It would be important to take into account that in the burying behavior test, false positives can occur if animals are unable to bury the electrified prod due to motor incoordination. Considering that both Amm and Amx at high doses (100 mg/kg) decreased motor coordination in the rota-rod test, it is necessary to be cautious in the interpretation of the data obtained with the administration of high doses of these compounds. It is possible

**Table 2**  
Effects of a single administration of Amm, Amx, and DZ, on the ambulatory activity and motor coordination tests.

Dose (mg/kg)	Open field test number counts/5 min		Inverted screen test (% of time)		Rota-rod test fall-of time (s)	
	Amm	Amx	Amm	Amx	Amm	Amx
0	86.76 ± 6.77	89.75 ± 4.72	100	100	> 300	> 300
0.01	98.90 ± 6.30	–	–	–	> 300	> 300
0.1	76.57 ± 7.73	79.5 ± 11.08	–	–	> 300	> 300
10	67.54 ± 6.27	90.06 ± 7.03	93.56	121.19	299.5 ± 13	299.7 ± 1.2
100	53.93 ± 8.10**	46.64 ± 9.62**	199.9	32.24	150.4 ± 1.9***	205.2 ± 6.1*
200	–	–	46.98	78.20	100.6 ± 2.0**	196.3 ± 0.1**
500	–	–	22.81	119.31	50.2 ± 4.5***	200.2 ± 4.6*
1000	–	–	25.22	22.64	12.5 ± 3.5***	180.5 ± 3.6***
	H=18.28, df=5, p=0.003	H=12.44, df=4, p=0.014	H=30.26, df=6, p≤0.001	H=22.78, df=6, p≤0.001	H=13.56, df=7 p≤0.001	H=19.5, df=7 p≤0.001
	<b>DZ</b>	<b>DZ</b>	<b>DZ</b>	<b>DZ</b>	<b>DZ</b>	<b>DZ</b>
0	83.10 ± 7.17	–	100	–	> 300	–
0.125	90.30 ± 12.23	–	–	–	–	–
0.25	96.77 ± 9.72	–	–	–	–	–
0.5	95.67 ± 12.10	–	–	–	–	–
1	71.87 ± 10.28	–	–	–	–	–
2	64.66 ± 10.28	–	65.66	–	139.2 ± 15.69	–
4	37.57 ± 6.98**	–	9.99	–	65.2 ± 8.95	–
	H=16.85, df=6, p=0.010	–	H=31.50, df=2, p≤0.001	–	H=25.3, df=2, p≤0.001	–

Results are expressed as average ± s.e.m. Statistical comparisons were made between the saline-treated group and the experimental groups using a Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks, followed by the Mann–Whitney rank sum test ( $p^* < 0.05$ ,  $p^{**} < 0.01$ ,  $p^{***} < 0.001$ ).

that at high doses of Amm and Amx, sedative rather than anxiolytic-like actions are taking place in the anxiety paradigms. This assumption is supported by the results obtained in the hole-board test and the burying behavior latency as it will be further discussed. This last parameter denotes animals' ability to react when confronted to an aversive stimulus (electrified prod). In this case, Amm and Amx (100 mg/kg) decreased mice reactivity. Amm has a stronger effect than Amx. Diazepam at high doses (2.0 mg/kg) induced an increase in burying behavior latency that did not reach statistical significance.

The hole-board model offers a simple method to measure the response of rodents to an unfamiliar environment that can detect sedative effects and depressant-like actions. In this animal model, the sedative effects of Amm and Amx were confirmed because the administration of this aqueous extracts induced a decrease in the exploratory behaviors (Fig. 2) These results support the idea that Amm and Amx produced an inhibition of CNS activity (reflected as a sedative action).

It has been extensively described that the anxiolytic-like and sedative effects of several glycosides of flavonoids are the consequence of a direct or an indirect interaction with the GABAergic system or by other interactions with different neurotransmitters such as the serotonergic or the opioidergic systems (Viola et al., 1995). Under the consideration that Amm and Amx have flavonoid derivatives, it can be suggested that these compounds could participate in the induction of both anxiolytic-like and the sedative actions.

Although the flavonoids metabolism is still not clear, it is assumed that glycosides and malonil esters of glycosides are absorbed as their aglycone after prior hydrolysis of the sugar moiety along the digestive tract. Based on this fact, our results suggest that the minor content of glycosides present in *spp. xolocoztiana* could explain the minor sedative and anxiolytic-like actions; hence their formation would decrease the central actions of the corresponding glycosides detected. It is tempting to suggest that the biologically active compounds contained in the extract of Amm and Amx such as flavonoids and their derivate partially interact with the GABAergic system to exert their actions by promoting a CNS depression.

Other bioactive compounds contained in the aqueous extracts could also interact with different neurotransmitter systems such as serotonergic or opioids that may also contribute to the sedative and anxiolytic-like effects of Amm and Amx, a possibility that remains to be further studies.

The forced swimming and suspension tail tests are the most useful animal models for the screening of new antidepressant drugs. The TST induced a mild moderate stress useful to predict mood states opposed to animals subjected to FST who suffer a high-stress that induced a state of "hopelessness" and/or "abandonment" greater than that induce with the TST in mice. These hopelessness states are analog to those symptoms observed in depressed people. It is well known that antidepressant drugs reduce this hopelessness-like behavior in mice in both the TST and the FST (Steru et al., 1985; Machado et al., 2008).

Our results showed that oral administration of a single dose of Amm induced a statistically significant increase in the immobility time, in the TST and in the FST in an opposite way to the effect induced by DIM (common antidepressant drug used as a reference). Amx treatments did not show significant differences with the control group neither in the TST nor in the FST, only the dose of 200 mg/kg increased this parameter.

The increase in the immobility time observed after Amm administration could be a consequence of unspecific actions on mice general activity and motor coordination. However, the lack of antidepressant-like effects could point out the possible mechanism through which Amm exerts its sedative actions. Most of the drugs that increase the GABAergic transmission produce sedation and drowsiness and have no antidepressant-like effects in animals or in human (Briones-Aranda et al., 2005; Nagatani et al., 1984). However, future studies are necessary to confirm this hypothesis.

Another aim of the present work was to evaluate the toxic effects and possible health risks of Amm and Amx consumption. To accomplish this goal, the possible damage on locomotor and motor coordination was determined in the rota-rod, inverted screen and open field tests. Also the acute toxicity was determined by calculating the LD<sub>50</sub>.



Motor coordination is a complex behavioral domain that can reflect balance, muscle strength, and patterned gait (Ginski and Witkin, 1994). The loss of motor coordination is a common characteristic of neurological impairment and it is a potential side effect of certain compounds such as barbiturates, benzodiazepines or alcohol and is one of the most observable effects.

Our results show that Amm- and Amx treatments produced a decrease in the time that the mice were able to maintain on the rota-rod. These effects indicate that both plants reduced motor coordination at high doses (100–200 mg/kg), like the effect induced with high dose of diazepam (4 mg/kg).

These results were consistent with those obtained in the inverted screen test, in which Amm-treated animals showed a remarkable muscle weakness from doses of 100 to 1000 mg/kg, reflected by a significant decrease in gripping time. Additionally, both Amm- and Amx-treated mice with 100 mg/kg showed a significant decrease in ambulatory activity in the open field test (Farkas et al., 2005; Estrada-Reyes et al., 2010b). Based on these results, we can conclude that Amm and Amx, with a dose of 100 mg/kg or higher, induced sedative-like actions that affect general activity, motor coordination and muscle strength. In most of the cases, Amm induced stronger actions in comparison with those induced by Amx or diazepam.

The acute toxicity resulting from the oral administration of both Amm and Amx extracts was measured according to Lorke's method. As mentioned before, with doses from 1.0 to 100 mg/kg Amm did not produce adverse effects, whereas 2600 mg/kg dose induced some adverse effects, such as diarrhea, ataxia and rash, however these effects disappeared within the first hour after treatment. The LD<sub>50</sub> Amm was higher than 5000 mg/kg, which according to the employed method; it can be considered non toxic.

Oral administration of Amx (1–100 mg/kg) produced diarrhea and diaphoresis. The administration of higher doses of Amx (5000 mg/kg) induced some toxic manifestations that persisted until the death of all experimental animals within a period of 24 h with a LD<sub>50</sub> of 3807 mg/kg; therefore, according to Lorke's method, this extract can be considered as lightly toxic. These results indicate that Amm intake has a higher index of security than that of Amx. However, the consumption of either Amm or Amx aqueous extracts does not imply health risk. However, it is important to carry out studies on the possible toxic effects produced by the chronic consumption of these medicinal plants.

## 5. Conclusions

We found that the aqueous extracts of the ssp. *mexicana* and *xolocotziana* at low doses (from 0.1 to 10.0 mg/kg) induced anxiolytic-like actions; while at higher doses (over 100 mg/kg) they induced sedative actions that affected general activity and motor coordination. These results indicate that Amm and Amx can cause a general inhibition of neural activity in the CNS. The aqueous extract of ssp. *mexicana* appears to be more potent than the ssp. *xolocotziana*, considering that at lower doses, Amm induced anxiolytic-like actions and that its sedative effects were stronger (as measured with the open field, rota-rod and inverted screen tests). In addition the lack of toxicity implies that the intake of these *Agastache* species does not involve significant health risk.

These results support the use of *A. mexicana* ssp. *mexicana* and ssp. *xolocotziana* in traditional medicine as an anxiolytic, a tranquilizer, and a sedative agent as well as a remedy to relief the "nervous" conditions. Additionally, this work contributes to knowledge of the chemical composition of aqueous extracts of two subspecies of *Agastache mexicana* and provides important valuable information about Mexican Extra Herbal Pharmacopoeia.

## Acknowledgments

The authors wish to thank Amelia Martínez Laurraquiu, Erendira García Rios and Carmen Márquez from the IMPRFM and Ma Isabel Beltrán Villalobos and José Juan Cruz Martínez from Cinvestav-IPN for their technical assistance. Also we appreciate the work of M.V.Z. Mario Aguilar Amaya for animal handling. The research was partially supported by the Project no. 190 from the "Fondo de apoyo para Proyectos de Investigación" (NC093620.0) from the INPRFM and by CONACYT, Project no. 185597 (to Rosa Estrada-Reyes) and CB2010/155255 (to Carolina López-Rubalcava).

## References

- Aguilar, A., Camacho, J.R., Chino, S., Jáquez, P., López, M.E., 1994a. Herbario Medicinal Del Instituto Mexicano del Seguro Social Información Etnobotánica, México.
- Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jáquez, P., López, M., 1994b. Plantas medicinales del herbario IMSS: cuadros básicos por aparatos y sistemas del cuerpo humano. Instituto Mexicano del Seguro Social, México D.F., p. 218.
- Argueta, A., Cano, L., Rodarte, M., 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, first ed. Instituto Nacional Indigenista Press, México, D.F. p. 1193.
- Briones-Aranda, A., Rocha, L., Picazo, O., 2005. Alterations in GABAergic function following forced swimming stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 80, 463–470.
- Bourin, M., Hascoët, M., 2003. The mouse light/dark box test. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 55–65.
- Bye, R., Linares, E., Ramamoorthy, T.R., García, E., Collera, O., Palomino, G., Corona, V., 1987. *Agastache mexicana* subs. *xolocotziana* (Lamiaceae). A new taxon from Mexican medicinal plants. *Phytologia* 62, 156–163.
- Crawley, J., Goodwin, F., 1980. Preliminary report of a simple animal behavior models for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13, 167–170.
- Crawley, J., Davis, L., 1982. Baseline exploratory activity predicts anxiolytic responsiveness to diazepam in five mouse strains. *Brain Res. Bull.* 8 (6), 609–612.
- De la Cruz, M., 1991. *Libellul de medicinalibus indorum herbis*; manuscrito azteca de 1552, según traducción latina de Jua Badiano. Segunda edición, Fondo de Cultura Económica: Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F.
- Diccionario enciclopédico de la medicina tradicional mexicana. Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana, 2009. Pérdida del alma. Consulted: [2/11/2013]. Available from: ([www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/termino.php?l=1&t=pérdida del alma](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/termino.php?l=1&t=pérdida%20del%20alma)).
- Estado de la información forestal en México, 2002. Comisión Europea de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Santiago de Chile.
- Estrada-Reyes, R., Martínez-Vázquez, M., Gallegos-Solis, A., Heinze, G., Moreno, J., 2010a. Depressant effects of *Chinopodium mexicanum* Benth. Govaerts (Lamiaceae) on the central nervous system. *J. Ethnopharmacol.* 130, 1–8.
- Estrada-Reyes, R., Aguirre, E., García-Argáez, A., Soto, M., Linares, E., Bye, R., Heinze, G., Martínez-Vázquez, M., 2004. Comparative chemical composition of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*. *Biochem. Syst. Ecol.* 32, 685–694.
- Estrada-Reyes, R., Ubaldo-Suarez, D., Araujo-Escalona, A.G., 2012. Los Flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Revista Salud Mental* 35, 375–384.
- Estrada-Reyes, R., López-Rubalcava, C., Rocha, L., Heinze, G., González, E.A.R., Martínez-Vázquez, M., 2010b. Anxiolytic-like and sedative actions of *Rollinia mucosa*; possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Pharma. Biol.* 48, 70–75.
- Extra-farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. México. Secretaría de Salud. 2001. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud, México, D.F., Mexico, p. 24.
- Farkas, S., Berzsényi, P., Kárpáti, E., Kocsis, P., Tarnawa, I., 2005. Simple pharmacological test battery to assess efficacy and side effect profile of centrally acting muscle relaxant drugs. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 52, 264–273.
- Fernández, N.R., Ramos, Z.D., Carranza, G.E., 2001. Notas sobre plantas medicinales del estado de Querétaro, México. *Polibotánica* 12, 1–40.
- Fernández, S.P., Wasowski, C., Paladini, A.C., Marder, M., 2004. Sedative and sleepenhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 77, 399–404.
- Ginski, M.J., Witkin, J.M., 1994. Sensitive and rapid behavioural differentiation of *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berlin)* 114, 573–582.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. NIH Publication No. 85-23. Revised 1985.
- Jamzad, Z., Grayer, R.J., Kite, G.C., Simmonds, M.S.J., Ingrouille, M., Jalili, A., 2003. Leaf surface flavonoids in Iranian species of *Nepeta* (Lamiaceae) and some related genera. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 587–600.
- Linares, E., Flores, B., Bye, R., 1988. Selección de plantas medicinales de México. Noriega Editores, México p. 125.
- Linares, E., Flores, B., Bye, R., 1995. Plantas medicinales de México: Usos y remedios tradicionales, second ed. Centro de Tecnología Electrónica e Informática (CETEI)



- y el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IB-UNAM), México
- Linares, E., Flores, B., Bye, R., 1999. Plantas Medicinales de México, usos y remedios tradicionales. Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM, México, D.F., México p. 195
- Lint, H., Epling, C., 1945. A revision of *Agastache*. *Am. Midl. Nat.* 33, 207–230.
- López-Rubalcava, C., Piña-Medina, B., Estrada-Reyes, R., Heinze, G., Martínez-Vázquez, M., 2006. Anxiolytic actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimolia* in two paradigms: possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Sci.* 78, 730–737.
- López-Rubalcava, C., Saldivar, A., Fernández-Guasti, A., 1992. Interaction of diazepam and serotonin anxiolytics. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43, 433–440.
- López-Rubalcava, C., Rogel-Salazar, G., Paez-Martinez, N., 2009. The conditioned defensive burying test in rats: an animal model of fear/anxiety. In: Rocha-Arrieta, L., Granados-Soto, V. (Eds.), *Models of Neuropharmacology*. Transworld Research Network, Kerala, India, pp. 133–147
- Lorke, D., 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* 54, 275–287.
- Machado, D.G., Kaster, M.P., Binfaré, R.W., Dias, M., Santos, A.R.S., Pizzolatti, M.G., Brighente, I.M.C., Rodrigues, A.L.S., 2007. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31, 421–428.
- Machado, D.G., Bettio, L.E.B., Cunha, M.P., Santos, A.R.S., Pizzolatti, M.G., Brighente, I.M.C., Rodrigues, A.L.S., 2008. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Eur. J. Pharmacol.* 587, 163–168.
- McArthur, R., Borsini, F., 2006. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84, 436–452.
- Marder, M., Viola, H., Wasowski, C., Fernández, S., Medina, J.H., Paladini, A.C., 2003. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 537–545.
- Martínez-Gordillo, M., Fragosó-Martínez, I., García-Peña, M.R., Montiel, O., 2013. Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana Biodivers.* 84, 30–86.
- Martínez-Vázquez, M., Estrada-Reyes, R., Araujo Escalona, A.G., Ledesma Velázquez, L., Martínez-Mota, L.A., Moreno, J., Heinze, G., 2012b. Antidepressant-like effects of an alkaloid extract of the aerial parts of *Annona cherimolia* in mice. *J. Ethnopharmacol.* 139, 164–170.
- Martínez-Vázquez, M., Estrada-Reyes, R., Martínez-Laurrabaquio, M., López-Rubalcava, C., Heinze, G., 2012a. Neuropharmacological study of *Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae) in mice: sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract. *J. Ethnopharmacol.* 141, 908–917.
- Molina-Hernández, M., Téllez-Alcántara, P., Martínez, E., 2000. *Agastache mexicana* may produce antiangiogenic-like actions in the male rat. *Phytomedicine* 7, 199–203.
- Mylvaganam, J., Butters, T.D., Cortina-Borja, M., Hunnam, V., Proia, R.L., Perry, V.H., Dwek, R.A., Platt, F.M., 1999. Delayed symptom onset and increased life expectancy in Sandhoff disease mice treated with N-butyldeoxyojirimycin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(11), 6388–6393.
- Nagatani, T., Sugihara, T., Kodaira, R., 1984. The effect of diazepam and of agents which change gabaergic functions in immobility in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 97, 271–275.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Mexico.
- Nwinyi, F.C., Kwanashie, H.O., 2009. Neuropharmacological effects of *Sorghum bicolor* leaf base extract. *Res. Pharma. Biotechnol.* 1, 1–008.
- Pinel, J.P.J., Treit, D., 1978. Burying as a defensive response in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 92, 708–712.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977a. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730–732.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M., 1977b. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 229, 327–336.
- Rizner, H., Hadolin, M., Knez, Z., Baumann, D., 2000. Comparison of antioxidative and synergistic effects of Rosemary extraction with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chem.* 71, 229–333.
- Rodríguez-Manzo, G., López-Rubalcava, C., Fernández-Guasti, A., 1999. Anxiolytic-like effect of ejaculation under various sexual behavior conditions in the male rat. *Physiol. Behav.* 67, 651–657.
- Smith, B.D., Sabin, M., Berlin, E.A., Nackerud, L., 2009. Ethnomedical syndromes and treatment-seeking behavior among Mayan refugees in Chiapas, Mexico. *Cult. Med. Psychiatry* 33, 366–381.
- Tortoriello, J., Romero, O., 1992. Plants used by Mexican tradition al medicine with presumed sedative properties: an ethnobotanical approach. *Arch. Med. Res.* 23, 111–116.
- Rzedowski, J., Calderon, G., 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. CONABIO. Instituto de Ecología y Centro Regional del Bajío, México, p. 1405.
- Sanders, R.W., 1987. Taxonomy of *Agastache* section *Brittonastrum* (Lamiaceae Nepeteteae). *Syst. Botany Monogr.* 15, 1–92.
- Santillán-Ramírez, M.A., López-Villafranco, M.E., Aguilar-Rodríguez, A., Aguilar-Contreras, A., 2008. Ethnobotany, leaf architecture, and vegetative anatomy of *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* and *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*. *Revista Mexicana Biodivers.* 79, 513–524.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simo, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berlin)*. 87, 367–370.
- Treit, D., 1985. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9, 203–222.
- Viola, H., Wasowski, C., M. Levi de Stein, M., Wolfman, C., Silveira, R., Dajas, F., Medina, J.H., Paladini, A.C., 1995. Apigenin, a component of *Matricaria reticulata* flowers, is a central Benzodiazepine receptor-ligand with anxiolytic effects. *Planta Med.* 61, 213–216.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2010. Plantas medicinales de la Farmacia Viviente del CEFOFOR: usos terapéuticos tradicionales y dosificación. Comisión Nacional Forestal, Coordinación General de Educación y Desarrollo Tecnológico, Mexico, D.F., Mexico, p. 172.
- Villavicencio, N.M.A., Pérez, E.B.E., Ramírez, A.A., 2002. Plantas útiles del estado de Hidalgo: Useful plants of the state of Hidalgo. 18. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México, pp. 241–243
- Zamora, M.L.I., Barquín, L.M. P., 1997. *Estudio de la relación planta-hombre en los municipios de Mineral del Monte y Mineral del Chico*. Estado de Hidalgo. (Ed.), Gobierno del Estado de Hidalgo. Pachuca de Soto, México
- Zolla, C., del Bosque, S., Tascon, M. A., Mellado C. V., Maqueo C., 1998. Medicina Tradicional y Enfermedad. El susto, pp. 83–99. Centro Interamericano de Estudios de Seguridad Social. In: Serrano, A.T., Montoya, A.B.J., Jasso, S.P., Moreno, J.A., 2012. *La investigación Social en México*. Ed Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo, México, CP 42000, isbn:978-607-482-280-9.

