





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

---

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO  
FARMACOGNÓSTICO DE LA SALVIA DE  
BOLITA (*Buddleja perfoliata* H.B.K.)  
UTILIZADA EN LA MEDICINA  
TRADICIONAL MEXICANA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN FARMACIA**

P R E S E N T A:

**GONZÁLEZ RODRÍGUEZ DAVID ISSAC**

**ASESOR:** QFB. BRIGIDA DEL CARMEN CAMACHO ENRIQUEZ

**COASESOR:** M. en C. LIDIA RANGEL TRUJANO

**COASESOR:** Q. MARIO ARTURO MORALES DELGADO

**COASESOR:** M. en C. MARÍA VERÓNICA VÁZQUEZ CIANCA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2017



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Contribución al estudio farmacognóstico de la Salvia de bolita (Buddleja perfoliata H.B.K.) utilizada en la medicina tradicional mexicana.**

Que presenta el pasante: **David Issac González Rodríguez**

Con número de cuenta: **412062447** para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Farmacia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Agosto de 2016.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Enrique Ángeles Anguiano	
<b>VOCAL</b>	Q.F.B. Brígida del C. Camacho Enríquez	
<b>SECRETARIO</b>	Q.F.B. Amparo Ramos Aguilar	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M.F.C. Beatriz de Jesús Maya Monroy	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M en C. Judith García Arellanes	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.(art. 127).

IHM/mmgm\*

---

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente, le doy gracias a Dios por brindarme de inmensas bendiciones durante mi formación profesional, por siempre estar conmigo y permitirme culminar con mis estudios y este trabajo.

Igualmente doy gracias a mis padres y mi hermana, quienes, con sus enseñanzas, y tantos sacrificios me guiaron hasta este punto de mi vida. Gracias por permitirme llegar hasta este punto de mi vida, gracias por todo el apoyo que siempre me brindaron, por siempre estar ahí por mí cuando yo lo necesitaba. Por siempre estaré en deuda con ustedes. Este trabajo se los dedico a ustedes.

También quiero agradecer a mis familiares que me han brindado tanto de su apoyo, mis primos, mi abuela Lupe, mis tías y tíos.

Le doy gracias a mis amigos que encontré en el laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica, principalmente a dos personas que conocí y rápidamente se convirtieron en dos de mis amistades más apreciadas en mi vida. Mtra. Brígida, Mtro. Mario, gracias por su incondicional y tan apreciado apoyo que me han dado desde que los conocí, gracias por confiar en mí, gracias por todas sus enseñanzas, gracias por ayudarme a encontrar qué es lo que más me gusta. Sepan que ustedes han sido y seguirán siendo una fuente de inspiración a lo largo de mi vida.

En este mismo laboratorio, encontré a grandes personas que rápidamente se convirtieron en mis amigos. Oscar, Ángel, Ale, Miriam, Ely, Mary Carmen, Lidia, Thalía, Sergio, Sara, Miguel, Imelda, Irene, Rulo y Cecilia. Gracias a todos por su apoyo, por su amistad, por todos los apreciados recuerdos (y kilos de más de tanto convivio) que me dejan de mi estancia en ese laboratorio. Les deseo el mayor de los éxitos en sus trayectorias.

Igualmente, agradezco a todos mis amigos que encontré en mi tiempo en la universidad, “las amorsh” (Raquel, Lilian, Jazmín, Erika), Rubén, Adrián, Abraham por aceptarme (y aguantarme) y darme todo su apoyo. Esos cuatro años que me permitieron compartir con ustedes se volvieron en una de las mejores experiencias que he tenido por mi vida. Creo que todos hicimos un gran equipo y trabajo en nuestra formación académica. Igualmente, no les deseo nada menos más que el mayor de los éxitos en sus vidas.

---

También deseo agradecer a la Mtra. Lidia Rangel. Por todo su apoyo y confianza que ha depositado en mí. Muchas gracias por sus enseñanzas que me han ayudado a mejorar mi forma de ser. Muchas gracias por la oportunidad que me dio de cumplir uno de mis más anhelados sueños, ejercer como docente. Sin duda alguna es una de las mejores experiencias que tuve en mi vida, y ciertamente una de las que jamás olvidaré.

Gracias igualmente a todas mis amistades que conozco desde mucho antes. Alan, Mariana, Isaac, Ricardo, Alejandro, Mauricio, Zark y Liliana. Gracias por todo su apoyo, por su confianza, por todos esos momentos que me han permitido estar con ustedes. Indudablemente, sin ustedes jamás hubiese llegado tan lejos.

Gracias también a profesores que confiaron tanto en mí, y que han sido de gran apoyo y ayuda durante mi desarrollo académico: Mtra. Juan José Díaz, E., Mtra. Veronica Vázquez C., Mto. Garduño Rosas, Dr. Fonseca Coronado, Dra. Raquel López, Antonio García, O.

Gracias igualmente a la Universidad Nacional Autónoma de México por alojarme en ella y haberme dado la oportunidad de retarme a mí mismo, de cambiar mi vida de dirección. Con compromiso llevaré el nombre de la institución y la carrera en alto.

Finalmente, gracias al apoyo del programa PAPIME PE204814 “ACTUALIZACIÓN Y FORTALECIMIENTO DE LA ENSEÑANZA EXPERIMENTAL DE LAS ASIGNATURAS DE FARMACOGNOSIA Y FITOQUÍMICA DE LA CARRERA DE LICENCIATURA EN FARMACIA Y LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA” por el financiamiento de este proyecto de tesis.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	4
0. ABREVIACIONES .....	8
1. INTRODUCCIÓN .....	9
2. MARCO TEÓRICO .....	11
2.1 La ansiedad y el estrés .....	11
2.2 Ansiedad y estrés en México .....	12
2.3 Ansiolíticos.....	13
2.3.1 Biotransformación .....	14
2.4 Modelos farmacológicos para evaluar el grado de ansiolisis en animales ...	15
2.4.1 Modelo de plus-maze .....	15
2.4.2 Modelo de tracción .....	16
2.4.3 Modelo de escalera .....	17
2.5 La Medicina Tradicional y su impacto en la sociedad.....	18
2.6 Plantas medicinales y su potencial en la investigación de nuevos fármacos y tratamientos terapéuticos.....	20
2.7 La estandarización como paso clave para la elaboración de productos fitoterapéuticos .....	20
2.8 Salvia de bolita. Una planta mexicana desatendida .....	21
2.9 Métodos de extracción en muestras vegetales .....	22
2.9.1 Maceración .....	23
2.9.2 Extracción asistida por microondas .....	23
2.10 Flavonoides .....	24
2.10.1 Cuantificación y detección.....	25
3. OBJETIVO GENERAL .....	26
4. OBJETIVOS PARTICULARES .....	26
5. HIPÓTESIS .....	26
6. METODOLOGÍA .....	27
6.1 Adquisición del material vegetal.....	27
6.2 Selección de las condiciones de extracción .....	27
6.3 Proceso de extracción y preparación de extractos .....	27

---

6.4 Estudio fitoquímico preliminar .....	28
6.5 Selección del estándar para la cuantificación.....	28
6.6 Cuantificación de flavonoides .....	29
6.7 Evaluación farmacológica .....	31
7. RESULTADOS.....	33
7.1 Certificación del material vegetal .....	33
7.2 Optimización de las condiciones de extracción .....	33
7.3 Estudio fitoquímico preliminar .....	35
7.4 Selección del estándar para la cuantificación.....	36
7.5 Cuantificación de flavonoides .....	38
7.6 Evaluación farmacológica .....	41
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	48
9. CONCLUSIONES .....	52
10. PROSPECTIVAS .....	53
11. BIBLIOGRAFÍA .....	54

---

## 0. ABREVIACIONES

- %CV = porcentaje de coeficiente de variación
- %EBA = Porcentaje de entradas a brazos abiertos
- %PBA = Porcentaje de permanencia en brazos abiertos
- Abs = absorbancia
- cm = centímetros
- CMA = Concentración de Muestra Analítica
- D = dosis
- DZP = Diazepam
- g = gramos
- HPLC = High Performance Liquid Chromatography
- IR = Infrarrojo
- MA = Muestra Analítica
- mg = miligramos
- mL = mililitros
- mta = muestra
- ng = nanogramos
- $R^2$  = coeficiente de correlación
- Rf = Ratio front / Constante de retención
- SB = Salvia de bolita
- SNC = Sistema Nervioso Central
- UV = Ultravioleta
- $\mu\text{g}$  = microgramos
- $\mu\text{L}$  = microlitros

---

## 1. INTRODUCCIÓN

Existen diversas enfermedades mentales que para la percepción de muchos no son notorias e inclusive para algunos no son consideradas enfermedades mentales, sin embargo, una parte considerable de la población suele experimentar estos tipos de males psiquiátricos. Los más comunes son el estrés y la ansiedad. El estrés se presenta mediante tensión física o emocional, en donde el sujeto se vuelve intolerante al medio físico o emocional, como pensamientos que generen frustración o la presencia de ambientes que no resultan agradables para el mismo, mientras que la ansiedad, se describe como una sensación de miedo, preocupación o un derivado de la excitación emocional. Una limitante que tiene esta enfermedad para su estudio, es que los factores que conducen a ella no siempre son los mismos y tampoco son constantes, es decir, que a diferentes personas les genera ansiedad diferentes situaciones. Algo que sí se ha definido es que éstas pueden ser igualmente físicas o emocionales, pues un individuo puede presentar ansiedad ante problemas o sucesos en la vida, así como, a la estancia en diversos lugares físicos que suelen ser desconocidos para él mismo (Larzelere, 2008).

En México, las patologías psicológicas más frecuentes son los síndromes ansiosos y depresivos. Se realizaron (Virgen, R. 2005) estudios en la población mexicana en 1999 donde se determinó que el 14.8% presentaba algún trastorno de ansiedad. Existen estudios que demuestran una mayor incidencia de estas enfermedades en gente de entre los 15 y los 45 años de edad, con una proporción mayor en las mujeres que en los hombres, es decir, de 2 a 1 respectivamente.

Para tratar las enfermedades anteriormente mencionadas, existen fármacos conocidos como ansiolíticos, que son fármacos depresores del sistema nervioso central (Mendoza, P. 2008), y los que actúan sobre la actividad de la serotonina.

Adicionalmente, a finales del siglo XX, se ha visto a nivel mundial, un incremento en el uso de las medicinas complementarias y alternativas, dentro de éstas se encuentra la medicina tradicional, por ejemplo, países desarrollados como: Australia un 48% de la población que utiliza algún tipo de medicina complementaria y alternativa, 70% en Canadá, 42% en EE UU, y 75% en Francia, lo que se traduce en ingresos de hasta 2300 millones de dólares anuales, como es el caso de Canadá. (Organización Mundial de la Salud. 2002).

Considerando lo anterior, la alta incidencia de estas enfermedades, y la negligencia ante el tratamiento de los pacientes, surge la necesidad de desarrollar fármacos con mejor desempeño y de baja toxicidad, así como fármacos que sean de síntesis poco costosa o bien que se empleen las plantas medicinales como una alternativa para estas patologías. Dentro de estas plantas contamos con la pasionaria (o flor de la

---

pasión), los toronjiles (blanco, rojo y azul), las flores de azar, etc, también entre ellas tenemos a la conocida como la salvia de bolita.

Existe también una tendencia a utilizar en conjunto las prácticas medicinales alopáticas y las tradicionales, por lo que surge una necesidad de estudiar tanto la planta (o una parte de la planta) utilizada tradicionalmente, como su actividad de la misma al usarse en conjunto con un medicamento alopático, pues en caso de que se presenten interacciones farmacológicas, o reacciones adversas, el profesional de la salud se encontrará con una notable carencia de información que le permita solucionar el problema de un paciente.

Existe una relación medicina tradicional-alopática donde la gente busca ocupar ambas tendencias o conocimientos de dichas medicinas para tratar sus enfermedades, por lo que surge una posible necesidad de aplicar los conocimientos formales en tecnología farmacéutica, con los de la farmacognosia, esto con el fin de desarrollar productos fitoterapéuticos. El desarrollo de este tipo de productos se puede volver atractivo en el país si se considera lo rico que es en conocimientos de plantas medicinales en variedad de especímenes. Sin embargo, a pesar de tener una gran variedad de conocimientos en plantas medicinales, éstas no suelen ser investigadas a profundidad o de una manera formal, como es el caso de la salvia de bolita.

Por todo lo anteriormente planteado, en el presente proyecto se busca obtener evidencia científica sobre el efecto ansiolítico de la salvia de bolita, pues no se cuenta con evidencia documental y experimental de la efectividad de esta planta para tratar problemas de ansiedad y/o estrés, y así de esta forma se tenga un panorama claro de futuras investigaciones en esta planta en caso de que sea pertinente.

---

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 La ansiedad y el estrés

El término estrés fue introducido a las ciencias de la salud en 1926 por Hans Selye, quien lo definió como la respuesta inespecífica del cerebro a una petición de alguien o por algo (National Institute of Mental Health). El estímulo que provoque la respuesta de estrés, se conocerá como estresor, los cuales pueden ser de tipo psicosocial o biogénicos. Sin embargo, existen otras definiciones de estrés, como:

- El estrés puede ser definido como una amenaza real o supuesta a la integridad fisiológica o psicológica de un individuo que resulta en una respuesta fisiológica y/o conductual). En medicina, el estrés es referido como una situación en la cual los niveles de glucocorticoides y catecolaminas en circulación se elevan (McEwen, 2000).
- El estrés como un estado de falta de armonía o una amenaza al homeostasis. La respuesta adaptativa puede ser específica, o generalizada y no específica. Así, una perturbación en la homeostasis resulta en una cascada de respuestas fisiológicas y comportamentales a fin de restaurar el balance homeostático ideal” (Chrousos, 1992).

El estrés se inicia ante un conjunto de demandas ambientales que recibe el individuo, a las que debe dar una respuesta adecuada poniendo en marcha sus recursos de afrontamiento.

Cuando la demanda del ambiente (laboral, social, etc.) es excesiva en relación con los recursos de afrontamiento que posee el individuo, desarrollará una serie de reacciones adaptativas, de movilización de recursos, que implican activación fisiológica.

A su vez, esta reacción se acompaña de una serie de emociones negativas (desagradables), entre las que destacan la ansiedad, la ira y la depresión. El estrés suele tener como manifestación la ansiedad, en cuyo caso se trata de una respuesta emocional provocada por un agente desencadenante (denominado agente estresante) interno o externo (Figura 1).

La ansiedad, además de ser una respuesta emocional al estrés, puede ser una reacción emocional de alerta ante una amenaza que puede originarse sin agentes estresantes. El estrés produce ansiedad, pero el individuo que padece ansiedad no necesariamente padece de estrés (<http://assets.mheducation.es/>, 6/10/2016).

El estrés afecta a una gran porción de la población mundial, sin embargo, a pesar de tener una gran incidencia, mucha gente puede ser incapaz de reconocer cuando lo presentan, éste puede afectar al individuo a nivel cognitivo y emocional. De acuerdo al departamento de Salud y Servicios de EEUU (US Public Health, 1999),

---

la ansiedad y el estrés contribuyen notablemente a la aparición de enfermedades mentales en personas de 18-54 años, lo cual es un rango de edades bastante considerable, otros trabajos, también sugieren que el estrés conlleva a enfermedades físicas.

El término “estrés” es imposible de medir de forma objetiva, pues no hay alguna métrica que nos permita conocer cuánto estrés presenta un individuo, por lo que el término no es muy útil en el ámbito científico, sin embargo, eso no quiere decir que éste no se estudie, pues se suele investigar qué clase de factores fomentan a la aparición del mismo.

El estrés, tanto a nivel cotidiano, como experimental, puede ser inducido por deberes socio-cognitivos o por la acción de hormonas de estrés. Éste puede llevar a cambios en la función de la corteza prefrontal y el sistema límbico, disminución de la atención y la memoria. Investigaciones también han sugerido que el estrés está relacionado con sensaciones del miedo. El estrés agudo conlleva a la activación del sistema nervioso simpático, donde se libera cortisol a través de la activación del eje hipotalámico-hipofisiario adrenal (Kubota, 2014).

Muchas decisiones en la vida suelen conllevar a una situación de estrés agudo, y viceversa; también se ha buscado evaluar si el estrés agudo es capaz de afectar la toma de decisiones de tipo moral (Starcke, 2011), sin embargo, los resultados han sido negativos, lo que se ha logrado demostrar en cambio, es que elevadas concentraciones de cortisol en humanos, efectivamente afectan la toma de decisiones de tipo moral.

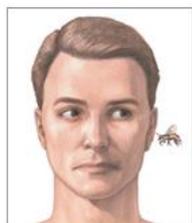
En cambio, los trastornos de ansiedad presentan un cuadro psicopatológico diverso, se caracterizan por molestias relacionadas o que son similares al miedo, como la desesperación, temor, preocupaciones excesivas, etc. Se estima que del 13.6% al 28.8% de la población padecerá un trastorno de ansiedad a lo largo de su vida (Heinze, 2010).

Los pacientes que padecen algún trastorno de ansiedad suelen tener repercusiones en su entorno social, pues se afecta la forma que interactúa con su alrededor, disminuye su eficiencia en el trabajo, entre otros.

## [2.2 Ansiedad y estrés en México](#)

Estudios de Medina Mora y cols. (2003), reportaron que el 28.6% de la población mexicana ha presentado alguno de los 23 trastornos mentales de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE). Ellos concluyen que 6 de cada 20 mexicanos han tenido trastornos psiquiátricos en algún momento de su vida, 3 de cada 20 en los últimos 12 meses, y 1 de cada 20 en los últimos 30 días. Más concretamente, el 14.3% de la población mencionó que ha tenido un trastorno de ansiedad alguna vez en su vida, el 8.1% los últimos 12 meses, y el 3.2% en el último mes.

Figura 1– Diferencias entre ansiedad y estrés. En ella se observa los gestos que representa la conducta en cada una de las patologías.



La causa del estrés es la presencia de un “factor estresante”



La ansiedad es el estrés que continúa después de que el factor estresante ha desaparecido

En ese mismo estudio, se demostró que sólo el 6.9% de los pacientes con algún trastorno de ansiedad han sido atendidos por un especialista en salud mental, y 4.8% por un médico general, mientras que el 0.8% de la población atendieron a la medicina alterna, como yerbero, quiropráctico, cura, espiritista, etc.

De acuerdo a encuestas realizadas en el 2010 por el Instituto Nacional de Psiquiatría (INP), el 6.4% de la población mexicana padece de ansiedad, es una de las enfermedades mentales con mayor incidencia en la población, y presenta una prevalencia del 18% aproximadamente a lo largo del último año (Heinze Martin & Camacho Segura, 2010).

En cuanto a estrés concierne, como se había comentado antes, no es medible por su subjetividad, porque no es considerada una enfermedad y porque los afectados del padecimiento, no lo consideran un motivo de consulta médica (Valderrama, 2012).

### 2.3 Ansiolíticos

El cerebro contiene alrededor de  $1 \times 10^{11}$  neuronas y alrededor de  $15 \times 10^{13}$  sinapsis, que son los sitios de unión entre neuronas. Es ahí donde sustancias químicas, llamadas neurotransmisores llenan el espacio que existe entre las uniones para que se produzca un potencial de acción o impulso nervioso y que éste cruce de una neurona a otra, hasta llegar a su sitio en donde se ejerce el efecto biológico o fisiológico, que pueden ser muy variables.

En fisiología, el estudio de lo anterior se llama neurotransmisión y consiste en una diversidad de pasos, que se inician en la captura del precursor del neurotransmisor, su transporte al sitio de síntesis, su síntesis como tal, su transporte a la vesícula, etc., hasta terminar con su desactivación o bien su recaptura hacia la presinapsis (Silbernagl. S., Despopoulos, A. 2008). Esta sustancia llamada neurotransmisor va a ligarse o unirse a una macromolécula que se localiza en la membrana o en el núcleo de la célula y que se le da el nombre de receptor. En el caso de los

---

ansiolíticos, los receptores donde se van a ligar son preferentemente el receptor GABA<sub>A</sub> y 5 HT<sub>1</sub>, cuyos ligandos son GABA (ácido gama amino butirico y serotonina respectivamente) y se localizan en la membrana de la célula.

Ya que GABA es un neurotransmisor inhibidor y serotonina en este caso también lo es, se define a los ansiolíticos como aquellas sustancias utilizadas para tratar la ansiedad y con ello ayudar al estrés, las cuales no producen sedación o sueño semejante al fisiológico (Randal, 2012).

Un fármaco ansiolítico efectivo debe reducir la ansiedad y tener un efecto calmante, afectando poco o nada las funciones motoras y mentales. Este grupo de fármacos a su vez se clasifican en barbitúricos y benzodiazepinas principalmente, pero existen los no benzodiazepínicos; sin embargo, en la actualidad las más utilizadas son las benzodiazepinas y por ello hablaremos un poco más de ellas.

Las benzodiazepinas usadas en la clínica ejercen en forma cuantitativa efectos similares, importantes diferencias cuantitativas en sus espectros farmacodinámicos y sus propiedades farmacocinéticas han llevado a patrones variables de aplicación terapéutica.

Las benzodiazepinas además de producir el efecto ansiolítico pueden producir una serie de diferentes acciones farmacológicas y existe una razón para creer que hay distintos mecanismos de acción que contribuyen en grado variable a los efectos sedantes-hipnóticos, de relajación muscular, ansiolíticos y anticonvulsivantes de las benzodiazepinas, además del ansiolítico.

El término benzodiazepina se refiere a la porción de la estructura compuesta por un anillo de benceno (A) fusionado a un anillo de diazepina de 7 miembros (B). Sin embargo, dado que todas las benzodiazepinas importantes contienen un sustituyente 5-arilo (en el anillo C) y un anillo 1,4- diazepina, el vocablo significa en realidad 5-arilo-1,4-benzodiazepina.

Por último, se debe mencionar que existen otros fármacos que se han utilizado para los trastornos de ansiedad como los antihistamínicos o los beta bloqueadores (estos últimos sobre todo para controlar las manifestaciones autonómicas de la ansiedad). La clonidina (un antihipertensivo) también se ha utilizado para tratar algunos trastornos de ansiedad, pero todos ellos en menor frecuencia (Rosalba, M.).

### 2.3.1 Biotransformación

El metabolismo hepático es el principal medio de depuración o eliminación de las benzodiazepinas. Este metabolismo tiene dos fases:

1. En la primera la mayoría de estos fármacos sufren oxidación microsomal, y
2. En la segunda estos metabolitos son conjugados por glucosiltransferasas que generan compuestos glucurónidos que son excretados en la orina.

---

Muchos de los compuestos que se generan en la primera fase son también compuestos activos, que pueden tener vidas medias incluso mayores que del fármaco original.

## 2.4 Modelos farmacológicos para evaluar el grado de ansiolisis en animales

El uso de modelos farmacológicos para evaluar el efecto terapéutico de sustancias con efecto en el Sistema Nervioso Central ha presentado algunos retos, pues algunos de los problemas que se tratan de erradicar pueden llegar a ser complejos, y en ocasiones, estos no pueden ser replicados en animales de laboratorio. Estos retos han llevado a la Farmacología (Neurofarmacología, o Farmacología Conductual) a integrar conceptos de la Psicología. Las áreas de investigación en la Farmacología Conductual con mayor interés son desórdenes psiquiátricos, dentro de los cuales se incluye la ansiedad, pues como se ha mencionado anteriormente, es un problema que puede afectar a un gran número de individuos.

El descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas con efecto en el SNC generó una necesidad de generar modelos farmacológicos más confiables, por lo que, de acuerdo a Lapa, J.A., y cols, se introdujo el término “validez” a estos modelos con el fin de asegurar la confiabilidad de los mismos. Por validez los autores describen que es “*La relación entre los resultados de un experimento de comportamiento y las observaciones clínicas del disturbio modelado*”. Existen tres niveles de validez, la validez predictiva (predictive validity), la validez objetiva (face validity), y la validez constructiva (construct validity).

### 2.4.1 Modelo de plus-maze

Este modelo lo propuso por vez primera en 1985 por Sharon Pellow, es un modelo de ansiedad incondicionada. Pero fue Lister quien lo usó por primera vez, este test o modelo incluye dos brazos cerrados y dos abiertos, situados perpendicularmente. Las medidas de las que consta son las siguientes: situación a 38,5 cm de altura, 30 cm de largo por 5 cm de ancho para los brazos y 15 cm de alto para las paredes de los brazos cerrados (Figura 2). Se asume que en los brazos abiertos del laberinto se produce una combinación de miedo: a) a un ambiente no familiar; b) a un espacio abierto intensamente brillante, y c) a una situación de equilibrio en una superficie relativamente angosta y situada a una considerable altura.

La iluminación que recibe el modelo es a través de dos bombillas de 60 W de color rojo. La duración de la sesión es de 5 min. En su inicio, se coloca al animal en el centro del laberinto, suspendido por la cola, de cara a uno de los dos brazos abiertos, al tiempo que da comienzo la videograbación o la evaluación.



Figura 2 - . Modelo de Plus-Maze. (Biopsychology Laboratory, 2015) En esta se aprecia el modelo que consta de dos brazos abiertos y dos cerrados.

Respecto a los parámetros evaluados, se toman dos tipos de medidas: las denominadas "espacio-temporales" o "clásicas", y las "etológicas".

A. Parámetros espaciotemporales:

- a) Número de entradas en los brazos abiertos.
- b) Número de entradas en los brazos cerrados.
- c) Tiempo que pasa el animal en los brazos abiertos.
- d) Tiempo que pasa en los brazos cerrados.
- e) Tiempo que pasa en el centro del laberinto.
- f) Número total de entradas en los distintos brazos.

B. Parámetros etológicos:

Desde hace unos años, algunos autores vienen llamando la atención sobre la necesidad de tomar en consideración otros parámetros, además de los clásicos, para mejorar la sensibilidad del test, su fiabilidad y su validez ecológica. Los nuevos índices van a ser el resultado de observar qué conductas son las que desarrolla el animal normalmente en el test y su localización física (paradas o limpiezas y bolos fecales) (Cárdenas, 2002).

#### 2.4.2 Modelo de tracción

Este test, utilizado para medir la actividad relajante muscular (Boissier, et al. 1961), consiste en suspender los ratones por sus patas delanteras de una barra metálica

horizontal de 1cm de diámetro y 15 de longitud, posicionado a 20cm de altura que se encuentra entre dos soportes. Un ratón normal trata de poner sus patas traseras sobre la barra en menos de 10 segundos (Figura 3). Si un animal es incapaz de sostenerse del alambre antes del tratamiento, debe ser descartado.

Una hora después de haber realizado el tratamiento, se vuelve a ejecutar la prueba. Si el ratón cae del alambre, o no logra sostenerse con sus patas posteriores después de tres intentos, se considera la respuesta como positiva de relajamiento muscular.



Figura 3 – Modelo de Tracción. (Fotografía por: David I. González. 2016. Facultad de Estudios Superiores C.)

#### 2.4.3 Modelo de escalera

Este test consiste en una escalera con 5 peldaños. Al animal se le permite explorar libremente el compartimiento, dirigiéndose la exploración del animal en torno a la escalera, subiendo y bajando escalones (Figura 4).

La evaluación en esta prueba se apoya en dos índices conductuales: a) frecuencia de 'rearings' (limpiezas y estiramientos), y b) número de veces que sube y baja por la escalera, se trata también de un modelo incondicionado y su duración es de 5 minutos. La premisa en la que se basa este modelo es que las sustancias ansiolíticas disminuirán el número de rearings, mientras que no se va a ver afectada la frecuencia con que sube y baja la escalera. Pero se sabe también que los fármacos ansiolíticos aumentan el número de escalones explorados por el animal (Steru, 1987; Cardenas, 2002).



Figura 4 – Modelo de Escalera (Fotografía por: David I. González. 2016. Facultad de Estudios Superiores C.)

## [2.5 La Medicina Tradicional y su impacto en la sociedad](#)

La medicina tradicional tiene una larga historia. Es la suma total de los conocimientos, capacidades y prácticas basados en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, bien sean explicables o no, utilizadas para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales (Organización Mundial de la Salud, 2013). Con base a esto, es importante señalar que la medicina tradicional y las plantas medicinales no son lo mismo, pero sí existe una relación muy estrecha entre ambas.

En México, la medicina tradicional se ha distinguido por su historia, la cual puede ser debida a diversos factores como su diversidad cultural o la notoria biodiversidad del país, donde incluso, México es el país con mayor flora medicinal de Latinoamérica. El uso de plantas medicinales se hereda desde culturas prehispánicas; Francisco Hernández, médico enviado al país por Felipe II, realizó una obra con más de tres mil plantas, donde la mayoría eran medicinales en base a información que le proporcionaban médicos indígenas del centro del país. Con el paso de los años, la medicina tradicional (y por ende, el conocimiento de plantas medicinales) se fue enriqueciendo de otras culturas médicas, como la humoral, proveniente de Europa (Zolla, 2012).

En la actualidad, sería lógico asumir que la medicina alopática ha desplazado notoriamente a la tradicional, esto tal vez podría ser cierto, sin embargo, se deben de considerar una serie de factores que se interrelacionan entre sí para comprender el estado actual de la medicina tradicional en el mundo:

- 1) No toda la gente tiene acceso a los servicios públicos de salud.
- 2) El alto costo de los medicamentos o terapias, los cuales no siempre pueden ser costeados en su totalidad por la población, ni el gobierno.

- 3) La negligencia de la población para acceder a los servicios de salud alopáticos.
- 4) Diversos factores sociales, entre otros.

Se han realizado trabajos que buscan tanto demostrar la exclusión de la medicina tradicional frente a la alopática, como los que buscan evidenciar su coexistencia y, hasta cierto nivel, una dependencia mutua. Se han realizado trabajos en distintas comunidades del mundo en donde se pone a prueba el conocimiento de la población sobre diversas enfermedades, su origen, y su cura, en los que se manifestó que la mayor parte de la población desconoce del tema, algunos otros que sus propias creencias son incompatibles con la evidencia científica y otros más que favorecen el uso de la medicina alopática cuando ésta está disponible (Seathre, 2007) (Vadebroek y cols., 2004).

En su contraparte, se han realizado investigaciones en múltiples sectores del mundo en donde el resultado, es distinto al mencionado anteriormente, ya que se encontró que la medicina tradicional suele usarse en conjunto con la alopática, o que la población está consciente de la existencia del tratamiento tradicional y el alopático (Scrimshaw & Cosminsky, 1980); inclusive, en una región de Nigeria Etkin y colaboradores (1990) descubrieron que los medicamentos usados en la terapia alopática son utilizados para la terapia tradicional, un fenómeno al que nombró como “indigenización de los medicamentos”.

Este tema ha sido de interés para múltiples investigadores, como en el trabajo de Peter Giovannini y colaboradores (2011), en el que puntualizaron que, como en algunos otros trabajos previos, los conocimientos de la medicina tradicional y la alopática coexisten entre sí, ya que los habitantes de la región conocían en su mayoría tanto las plantas medicinales que se les presentaba, como algunos medicamentos comerciales y su uso. Este es un resultado interesante, pues la comunidad se encuentra notablemente alejada de una farmacia y/o un hospital. En esta investigación también resalta una interesante tendencia, en la cual, conforme aumenta el grado de escolaridad, disminuye el uso de las plantas medicinales y aumenta el de los medicamentos alopáticos. También resalta un caso particular donde la hija de un curandero, relata que su padre hacía uso de los medicamentos alopáticos junto con las plantas medicinales. Esto lleva a concluir a los investigadores, que inclusive en poblaciones remotas, ambas prácticas han sido utilizadas en conjunto. Finalmente, proponen que, en lugar de medir el conocimiento o uso de cada tipo de medicina por separado, se deberían evaluar ambos conocimientos en conjunto como “interés general en conocimientos médicos” (Giovannini P., et al., 2011).

---

## 2.6 Plantas medicinales y su potencial en la investigación de nuevos fármacos y tratamientos terapéuticos

Para iniciar esta parte de nuestro estudio, es necesario mencionar qué es la Fitofarmacología, Hernández Abel lo define como: *“Rama de la farmacología que se orienta al estudio de los extractos estandarizados de las plantas medicinales...”* - Hernández Chávez Abel, (2013).

En las últimas décadas se ha observado un incremento en el número de pacientes que recurren a las plantas como recurso terapéutico lo que conlleva al riesgo en el uso indiscriminado y sin fundamento científico. Las plantas medicinales conforman un potencial de posibilidades para el tratamiento de distintos padecimientos, pero su uso deberá ser sostenido por dos pilares, denominados seguridad y eficacia, que garantizan la calidad del recurso fitoterapéutico utilizado.

Si bien es cierto que ya existen productos con actividad terapéutica hechos a base de plantas, estos suelen carecer de un desarrollo adecuado o investigación clínica básica, fomentando así a la aparición de los “productos milagro”, los cuales, las entidades de salud gubernamentales han tratado de detener (El Economista, 2015).

La forma de evitar que estos actos continúen sucediendo, es mediante la “formalización” de la industria de los productos hechos a base de plantas; uno de los requisitos para lograr esto es mediante la estandarización tanto de las materias primas (materia vegetal, extractos, etc.), como del producto fitoterapéutico.

## 2.7 La estandarización como paso clave para la elaboración de productos fitoterapéuticos

Para lograr que la medicina alternativa sea aceptada tanto a nivel nacional, como internacional, es necesario llevar a cabo una actualización de la medicina herbolaria. Una de las formas más lógicas de lograr esto es mediante la implementación de sistemas de calidad, así como la estandarización, esto aplica tanto para los materiales vegetales a emplear, como a los procesos realizados para obtener el producto final. Dada la complejidad química de las plantas, es necesario cerciorarse que siempre que se provea a algún paciente de un remedio herbolario o fitoterapéutico, éste será efectivo y seguro. Sólo mediante la estandarización y la validación de procesos se logrará esto. En un extracto, por ejemplo, se debe de asegurar que éste tenga una concentración mínima de ciertos compuestos (Mandal, Mandal, & Kumar Das, 2015).

La estandarización de los productos fitoterapéuticos es la descripción y reunión de un conjunto de características rigurosamente controlables que llevarán a constituir una monografía oficial para la propuesta de una preparación de una forma medicinal

---

a base de una planta. La monografía deberá reunir una serie de características normalizadas de una preparación de droga o extracto con su perfil específico farmacognóstico, químico, biológico y farmacéutico.

Algunas adversidades que presentan los productos fitoterapéuticos es que no se cuenta con un número adecuado de pruebas farmacopéicas que permitan tener un nivel de seguridad deseable en los productos terminados, también lo es la carencia de buenas prácticas de manufactura que estén bien definidos y regulados. La falta de atención a la calidad de los fitoterapéuticos está comprometiendo el verdadero potencial de los remedios herbolarios, donde el problema principal pareciera ser la falta de métodos analíticos simples y confiables.

La estandarización en la industria de fitoterapéuticos engloba buenas prácticas de agricultura, de laboratorio (tanto para caracterización, extracción y aislamiento), validación de métodos analíticos y buenas prácticas de manufactura.

Como se puede apreciar, la estandarización requiere un alto nivel de conocimientos en fitoquímica, análisis químico, farmacognosia y tecnología (como de procesos, farmacéutica, entre otras adecuadas), ya que sólo así se asegurará la calidad requerida de un producto terapéutico.

### [2.8 Salvia de bolita. Una planta mexicana desatendida](#)

La *Buddleja perfoliata* HBK es un arbusto de un metro de altura. Tiene muchas ramas y muchos tricomas estrellados, es de color verde-amarillento. Las hojas son lanceoladas oblongas y aterciopeladas en ambas caras. Las flores son amarillas y tienen un olor agradable. Es originaria de México. Género nativo de los trópicos y subtropicos de Norteamérica y Sudamérica.

La *Buddleja perfoliata* HBK se distribuye en su mayoría en los estados de San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo y Puebla. Los nombres populares con los que se conoce son “salvia de bolita” o “salvia real”, sin embargo, en el mercado de Sonora, la identifican mayoritariamente como “salvia de bolita”.

Se reporta que la salvia de bolita se emplea como antisudorífico, diurético, para desinfectar heridas, y contra las infecciones gastrointestinales. Otros usos que se reportan son para tratar los mareos, nervios y soplos del corazón (Universidad Nacional Autónoma de México, 2009).

A pesar de los amplios usos que se le da, y a lo ampliamente distribuida que se encuentra en la región, la Salvia de bolita carece de estudios, siendo el más reciente un estudio por el Dr. Ávila Acevedo José Guillermo, en 2002, quien elaboró un estudio fitoquímico de ésta y evaluó su actividad antibacteriana y fotoprotectora.

---

Esto adquiere más impacto al considerar que en los puestos callejeros se puede conseguir esta planta simplemente con el nombre de “Salvia”.

## 2.9 Métodos de extracción en muestras vegetales

Una de las etapas iniciales clave en el análisis químico y/o farmacológico de materiales vegetales, es elegir el proceso de extracción, los cuales tienen como finalidad extraer una serie de compuestos de una matriz biológica, como de las células. (Mandal, Mandal, & Kumar Das, 2015). Para el proceso de extracción se puede utilizar materiales secos triturados o frescos. Esto será dependiente del tipo de metabolitos que se desea extraer, pues en materiales frescos se puede fomentar a que haya reacciones enzimáticas que degraden los metabolitos mismos (Villar, 1999).

Cuando se conoce la ubicación de algún metabolito dentro del material vegetal, y/o cuando se saben la naturaleza química del metabolito o metabolitos de interés, la selección del método de extracción se vuelve más sencilla, sin embargo, esto no implica que no se deba seleccionar un método adecuado de una forma lógica. Se debe tener como máxima prioridad el obtener un extracto con los metabolitos deseados con un alto rendimiento.

Sin embargo, existen ocasiones en las que simplemente no se tiene conocimiento de ninguna de estas características. Por las cuestiones mencionadas en el subtema de “*Salvia de bolita. Una planta mexicana desatendida*”, ese fue el caso de este proyecto, en especial porque el efecto farmacológico que se buscaba no estaba estudiado. Cuando se presenten estos casos, la mejor forma de proceder con el análisis es mediante la extracción de metabolitos secundarios utilizando diferentes disolventes y mediante diferentes métodos de extracción, identificando cuáles dan mejores rendimiento y mayor variedad de metabolitos.

El alcohol es por lo general un solvente de muchos componentes de las plantas, por lo que puede llegar a presentar adversidades al momento de aislar compuestos o cuando se desea extraer un grupo de metabolitos específico. Sin embargo, cuando no se conocen las características químicas de los metabolitos secundarios presentes en una planta es un buen disolvente de partida para realizar las extracciones de la misma (Evans, 2009).

En la actualidad existen diversos métodos de extracción, sin embargo, todos tienen la misma finalidad: extraer la mayor cantidad posible de metabolitos secundarios de interés de una matriz en particular.

### 2.9.1 Maceración

La maceración, es un método de extracción simple el cual es utilizado preferentemente cuando se tienen materiales volátiles o termolábiles. Se realiza sin temperatura y se utiliza cualquier solvente. Es uno de los métodos más utilizados porque es de muy bajo costo y permite obtener un número determinado de compuestos, dependiendo de las condiciones que se le impongan, como aceites esenciales (Anup , Vivekananda, & Subhash, 2015).

En este método, el solvente penetra las células gradualmente y disuelve el contenido de la célula o provoca la ruptura de la célula, liberando su contenido.

Usualmente durante este proceso, se tiene el solvente y la materia prima en agitación ligera para favorecer la penetración del solvente en el material vegetal. Es un método que requiere que el solvente y materia prima estén en contacto por suficiente tiempo, por lo que puede durar de pares de horas, hasta días.

A continuación, se muestra el proceso ideal de maceración:

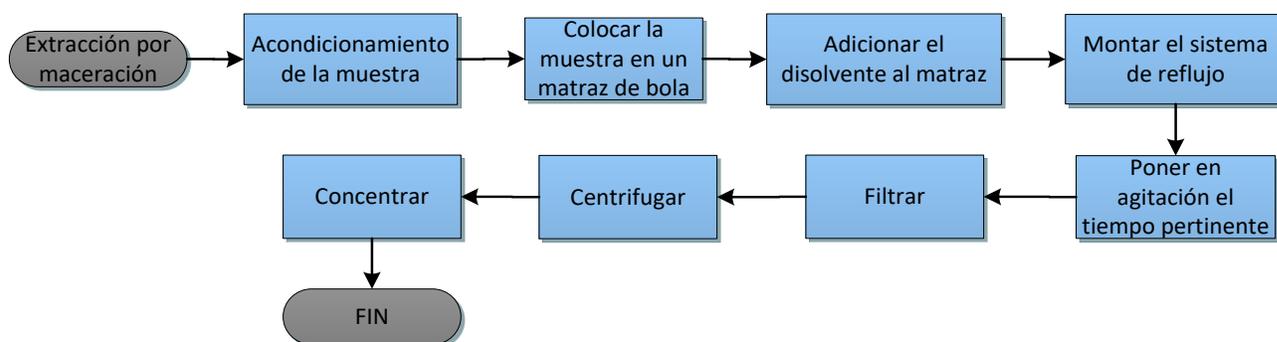


Diagrama 1 Procedimiento Genérico de Extracción por Maceración (Anup , Vivekananda, & Subhash, 2015)

### 2.9.2 Extracción asistida por microondas

El microondas calienta las moléculas de cualquier objeto por un mecanismo dual de conducción iónica y rotación de dipolo. Los microondas son las ondas electromagnéticas no-ionizantes situadas entre el espectro electromagnético de las ondas de radio y el infrarrojo con una frecuencia entre 300MHz y 300GHz. Los dos tipos de campos oscilantes perpendiculares que generan microondas son el eléctrico y el magnético.

El principio de la extracción por microondas radica en la humedad remanente en el material vegetal seco, pues dicha humedad se calienta dentro de las células de la planta, hasta que ésta se evapore, cuando esto sucede se genera una elevada presión sobre la pared de la célula, haciendo que ésta se estire, y finalmente, sufra

---

una ruptura, favoreciendo la salida de compuestos de las células rotas hacia el solvente en el que se calienta. Esto permite aumentar en la mayoría de los casos el rendimiento del proceso de extracción (Anup , Vivekananda, & Subhash, 2015).

Se puede mejorar el proceso de extracción si la planta se humedece con solventes con una mayor eficacia de calentamiento, es decir, que liberan más energía conforme son más calentados. Esto se debe a que se favorece la hidrólisis de las uniones éter de la celulosa en la pared celular, disminuyendo la resistencia mecánica de la pared y favoreciendo a que el solvente ingrese más fácilmente a la célula y arrastre compuestos.

Uno de los inconvenientes que presenta este método de extracción es que el aumento de temperatura puede afectar la integridad de algunas de las moléculas que son extraídas, sin embargo, esto se puede solucionar con diversos aditamentos para el equipo, como generando una atmósfera inerte para que no se oxiden los compuestos, o generando un vacío para que la temperatura no se eleve demasiado y que esto no comprometa la eficiencia de la misma.

## 2.10 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de moléculas pertenecientes al grupo de los polifenoles (Marín, et al. 2002), con una gran variedad de usos, como biológicos, nutrimentales, entre otros. Estos compuestos se derivan del metabolismo por la vía del ácido shikímico y de las acetogeninas.

Los flavonoides se clasifican en: flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas, antocianinas, y proantocianidinas (Merken & Beecher, 2000).

Éstos son un grupo de metabolitos secundarios de biosíntesis mixta con una estructura básica característica formada por un esqueleto carbonado C6-C3-C6; éstos pueden contener un anillo central, que son los más abundantes, o una estructura abierta como las chalconas, que son los precursores de los cíclicos. (Kohlheimer, 2003). Los flavonoides en las plantas se encuentran mayoritariamente unidos a una azúcar, como la glucosa.

Estas sustancias se encuentran en una gran variedad de fuentes naturales, como plantas, frutas, vegetales, semillas, etc. Presentan una buena actividad antioxidante y se pueden encontrar fácilmente en la dieta de un humano. Ha surgido un creciente interés para su uso como nutracéuticos; aunque es importante precisar que también existe un extenso interés farmacológico por estas sustancias, como actividad anticancerígena (*in vitro*), antiviral, anti-inflamatoria, etc (Dangles, et al. 2001).

### 2.10.1 Cuantificación y detección

Considerando la amplia distribución de estos compuestos en la naturaleza, y la aplicación de los mismos en diversos productos alimenticios y/o terapéuticos, surge la necesidad de tener métodos analíticos que permitan detectar y cuantificar estas sustancias con precisión y seguridad.

Existen diversos métodos de cuantificación, pero la gran mayoría se fundamenta en las sustituciones –OH, la aromaticidad de los anillos, o los grupos carbonilo para generar una respuesta analítica.

Dangles y cols. (2001), muestran algunos métodos de cuantificación por medio de espectroscopia de fluorescencia, uno de los métodos es utilizado para cuantificar flavonoides unidos a albúmina, existen métodos similares donde se utiliza quercetina como indicador, pues ésta permite identificar los sitios de unión de los flavonoides ante la albúmina.

Merken y Beecher (2000) desarrollaron un método para cuantificar diversos flavonoides en su forma de aglicona presentes en algunos alimentos de consumo común. La técnica analítica empleada fue a través de HPLC de fase reversa. La fase móvil consistió en agua, metanol, y acetonitrilo. El método tiene un límite de detección de 9.3 a 44.8ng.

Pieta y Mauri (2001), sugieren que, para asegurar la precisión y confiabilidad de los resultados, se debe de hacer uso de técnicas como HPLC y electroforesis capilar acoplada a UV y/o espectrometría de masas. En su trabajo se realizan algunos comentarios sobre el comportamiento de los flavonoides al ser utilizados en técnicas de HPLC, especificando que los tiempos de retención aumentarían conforme aumente el número de grupos –OH presentes en la molécula.

Si bien existen métodos novedosos de análisis instrumental, como la cromatografía líquida de alto rendimiento, espectrometría de masas, etc., es importante recordar que, como se mencionaba previamente, una limitante que presenta la industria de los fitoterapéuticos es la carencia de métodos analíticos simples, confiables y baratos, por lo que un análisis por medio de espectrofotometría de UV-Visible es una buena alternativa para satisfacer dicha necesidad.

La presencia de un gran número de flavonoides con diferentes combinaciones que son posibles a través de las agliconas polihidroxiladas y su número limitado de mono y disacáridos es estudiada por espectroscopia UV-Visible, debido a que la longitud de onda a la que absorben es única para cada sustancia, por ejemplo, el espectro UV de las flavonas y glicósidos relacionados presenta usualmente dos picos de absorción entre 300-380nm, y 240-280nm.

---

### 3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la fracción hidrosoluble del extracto hidroalcohólico de la planta salvia de bolita (*Buddleja perfoliata* H.B.K.) a través de ensayos químicos y farmacológicos para contribuir al estudio basado en evidencias de las plantas medicinales mexicanas.

### 4. OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar la planta en estudio, entregando una muestra del material vegetal a emplear en el Herbario Etnobotánico IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala para su identificación y registro, de modo que provea la autenticidad de la planta que se utilizará en el experimento.
- Estimar los posibles metabolitos que se encuentran presentes en la planta mediante la realización de un tamizaje Fitoquímico que sirva como marco químico de referencia.
- Cuantificar los flavonoides presentes en un extracto de *Buddleja perfoliata* mediante un método espectrofotométrico para ayudar a evaluar el rendimiento del proceso de extracción y evaluar la correlación con el estudio farmacológico.
- Evaluar y comparar el efecto ansiolítico del extracto del *Buddleja perfoliata* con un fármaco de referencia y la quercetina (flavonol), mediante una curva dosis-respuesta para comprobar si realmente posee dicho efecto.
- Plantear y estructurar un panorama para futuras investigaciones tanto fitoquímicas como farmacológicas para la *Buddleja perfoliata* H.B.K. para impulsar el estudio basado en evidencias. de la medicina tradicional mexicana.

### 5. HIPÓTESIS

Si uno de los grupos metabólicos del extracto hidroalcohólico de la planta *Buddleja perfoliata* son los flavonoides, entonces al evaluar la cantidad de éstos en la planta, así como su actividad biológica, se podrá comprobar y correlacionar su acción ansiolítica.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Adquisición del material vegetal

Se adquirió el material vegetal fresco en el Mercado de Sonora, delegación Venustiano Carranza, Ciudad de México. El comerciante lo vende únicamente los días martes y proviene de Ozumba, Estado de México.

Se herborizaron tres muestras de material vegetal para ser enviadas al herbario IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

### 6.2 Selección de las condiciones de extracción

Para definir las condiciones de extracción, se definieron como variables del experimento: Tiempo de extracción (2, 3 o 24 horas) y proporción de los solventes a utilizar (Mezclas agua alcohol 1:1, 2:1, o 1:2). La variable de respuesta fue la cantidad de material extraíble.

Se realizó este estudio con la intención de definir cuáles serían las condiciones que brindarán de una mayor cantidad de material extraíble y de manera constante para asegurar que en el resto de los estudios, el método de extracción no fuera una variable potencial.

### 6.3 Proceso de extracción y preparación de extractos

Los extractos fueron preparados mediante el método de maceración y extracción asistida por microondas, dependiendo de lo que fuera necesario. Estos extractos fueron concentrados por destilación a presión reducida utilizando un rotavapor marca Büchi a 100rpm y T° de 32°C.

A menos de que el extracto fuera requerido para otra prueba, los extractos se prepararon utilizando una mezcla 1:1 de agua destilada y etanol. El método de extracción por maceración se muestra en el diagrama 2.

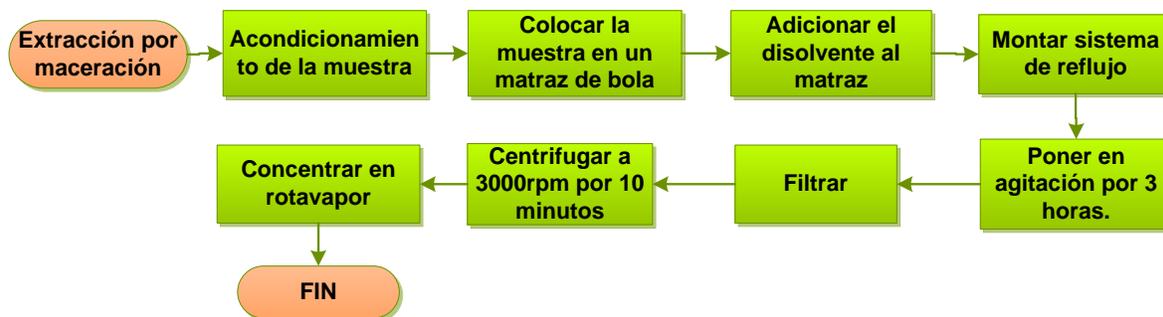


Diagrama 2 – Metodología de maceración

La extracción asistida de microondas se realizó en un horno de microondas comercial marca General Electric con una intensidad variable. El control de la temperatura se llevó a cabo con un termómetro de infrarrojo marca Taylor.

El método para la extracción asistida por microondas se muestra en el diagrama 3.

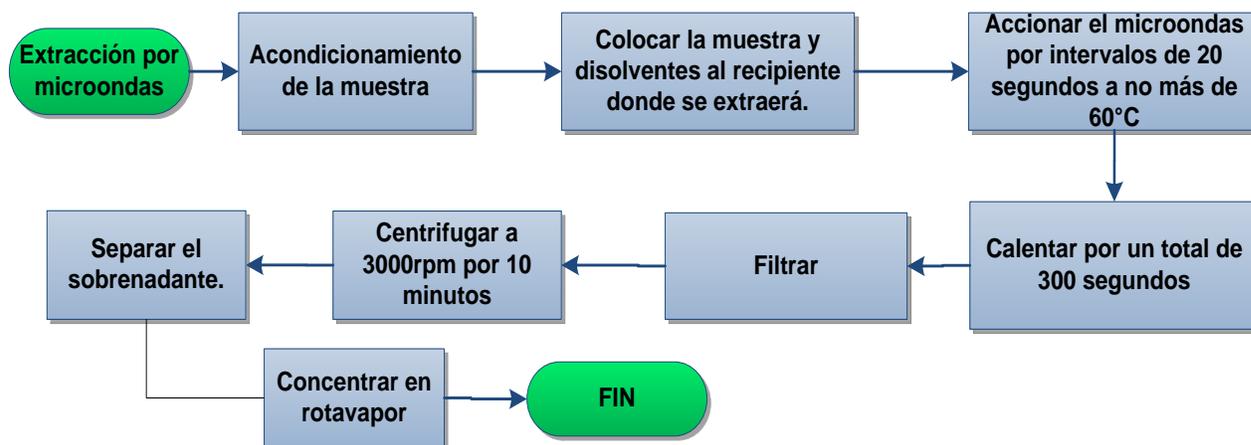


Diagrama 3 – Metodología empleada para extraer por microondas

#### 6.4 Estudio fitoquímico preliminar

El estudio fitoquímico preliminar permite tener al analista una estimación del tipo de metabolitos que puede contener un extracto vegetal. La técnica es una marcha analítica de carácter cualitativo, por lo que sus resultados se limitan a únicamente indicar la clase de metabolitos presentes (polifenoles, alcaloides, etc), más no metabolitos específicos (quercetina, piperina, etc). El tamizaje se realizó en un extracto hidroalcohólico de salvia de bolita obtenido por maceración.

El tamizaje fitoquímico que se realizó se muestra en el diagrama 5.

#### 6.5 Selección del estándar para la cuantificación

Durante el desarrollo del experimento, se comprendió que para tener una mejor visión de los componentes que podía tener el extracto, y por ende lograr cuantificar, se debía de identificar algunas moléculas que posiblemente estaban contenidas en el mismo.

Dado que el extracto, con base al tamizaje fitoquímico preliminar que se realizó, tentativamente contenía flavonoides, y que algunos de estos, como la quercetina tienen efecto ansiolítico (D'Andrea, 2015), se decidió realizar cromatografías de capa fina utilizando el extracto y los siguientes estándares: quercetina, hesperidina, naringina y rutina. Los estándares fueron adquiridos con Sigma-Aldrich en el año 2014.

Si bien la cromatografía en capa fina es una técnica cualitativa considerablemente antigua, su precio es notablemente bajo, es rápida de hacer y no requiere habilidades especiales por parte del analista, por lo que resultó muy conveniente de realizar dado el acceso que se tenía a recursos tecnológicos y de insumos para los análisis.

Se utilizaron placas cromatográficas de gel de sílice 60 F254, no modificada marca Merck de dimensiones de 20cm x 20cm, las cuales se activaban en una estufa a 60°C antes de ser utilizadas.

Las placas se colocaron en una mezcla BAW (n-butanol, Ácido Acético, Agua) 5:1:4, se aplicó una cantidad suficiente de muestras en cada punto inicial (1cm arriba del borde inferior) y se dejó eluir hasta 1cm abajo del borde superior, para así retirarlas y permitir que se evaporarán los solventes. Posteriormente se reveló con yodo y se realizaron las observaciones en una cámara de luz UV. Las muestras de extracto vegetal para esta prueba se prepararon por maceración, extracción asistida por microondas y por fuerza mecánica empleando un Potter.

### 6.6 Cuantificación de flavonoides

Se llevó utilizando el procedimiento descrito por Hongbin y cols. (2010) y que se presenta en el diagrama 4. Las cuantificaciones se realizaron con un espectrofotómetro marca Dynamica modelo Halo XB-10 con un rango de longitud de onda de 190 a 1000nm y celdas de cuarzo.

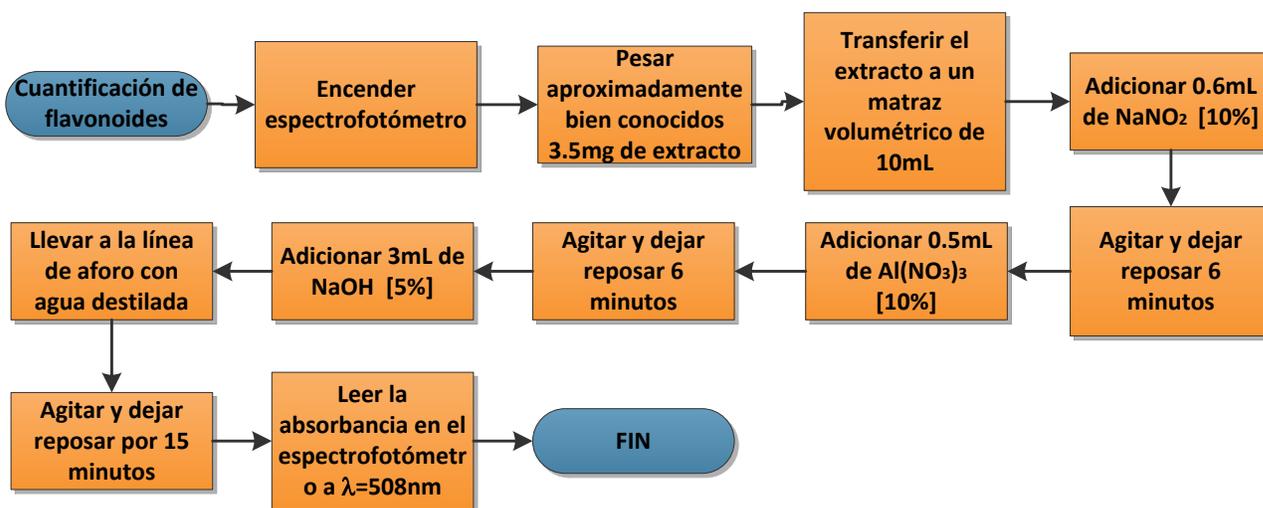
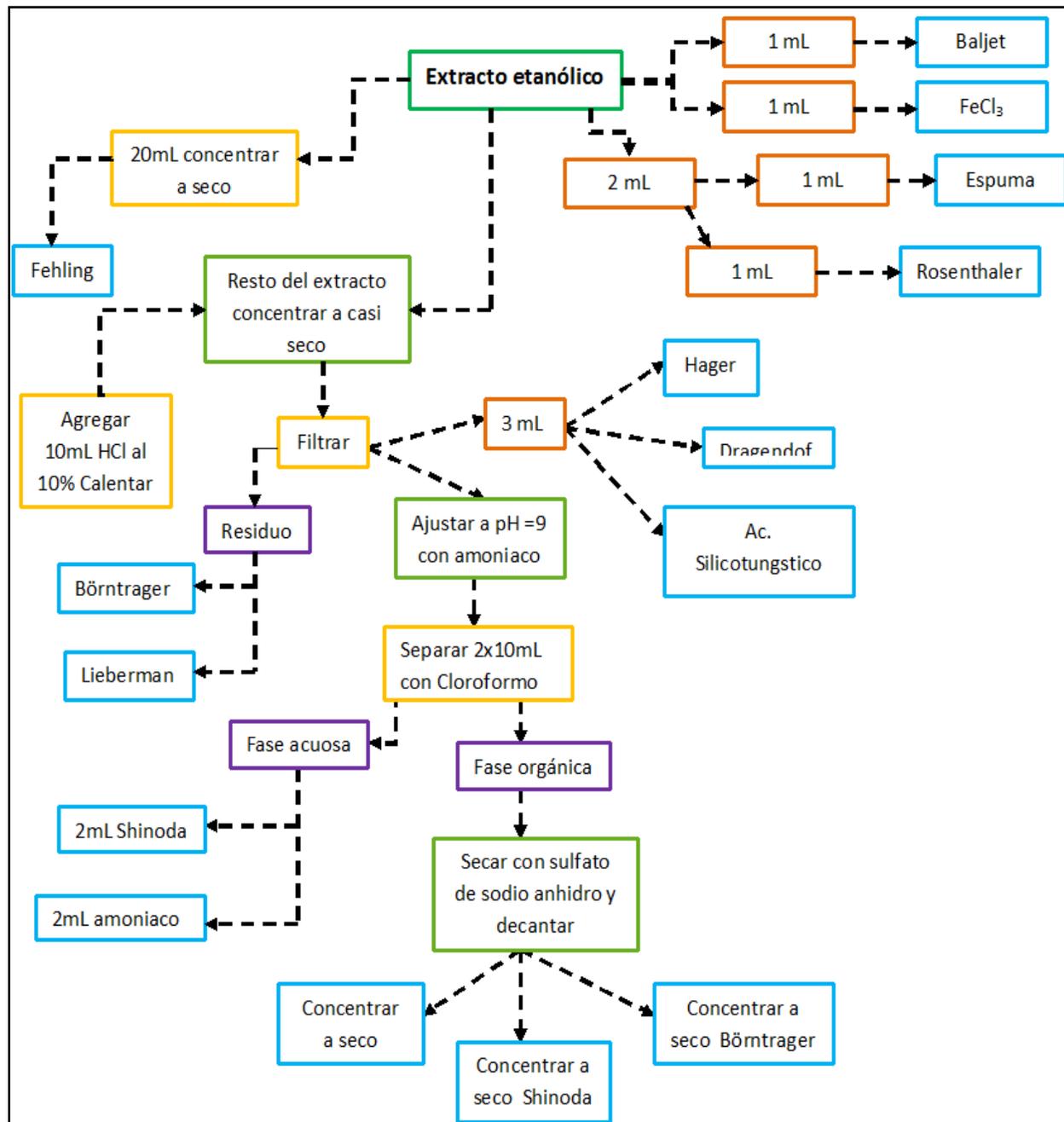


Diagrama 4 – Procedimiento para cuantificar flavonoides. (Hongbin y cols., 2010)

Diagrama 5 – Tamizaje Fitoquímico Preliminar



## 6.7 Evaluación farmacológica

Antes del estudio farmacológico, los animales se tuvieron en condiciones ambientales, con un ciclo luz - oscuridad de 12:12 horas, con comida y agua *ad libitum* durante 7 días. El día de la experimentación los animales se colocaron en el cuarto donde se realizaban las evaluaciones con luz roja, una hora antes de iniciar la evaluación, ésta se realizaba entre las 8:00 y 14:00 horas, en las mismas condiciones ambientales. Todas las sustancias fueron administradas por vía oral. Finalmente, los modelos utilizados se limpiaban con un trapo humedecido con una solución de alcohol al 5% entre cada medición.

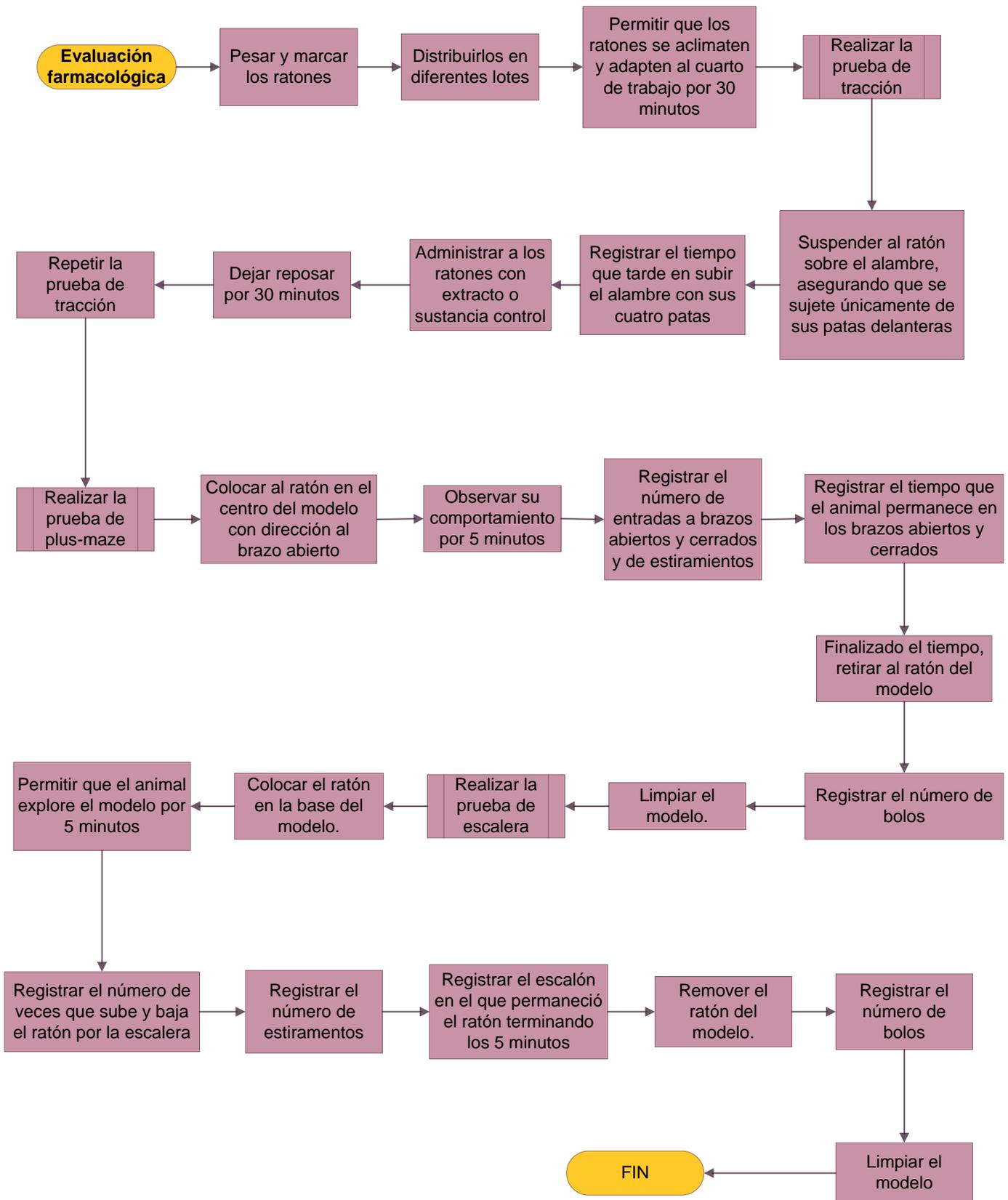
Para la evaluación farmacológica se utilizaron los modelos farmacológicos (Diagrama 6):

- Plus-maze
- Tracción:
- Escalera
- Pasividad

Las especificaciones de cada modelo fueron las siguientes:

- Modelo de tracción: El modelo fue realizado con una base de madera con dos soportes de madera distanciados entre sí por 18 cm y conectados por un alambre a una elevación de 20 cm.
- Modelo de Plus-Maze: El modelo empleado constó de una superficie de madera elevada a 15 cm del suelo. Los brazos abiertos tenían una longitud de 35 cm y un ancho de 5 cm. Los brazos cerrados adicionalmente a las dimensiones de los brazos abiertos, tenían paredes de 30 cm de alto pintadas de color negro.
- Modelo de escalera: El modelo fue elaborado con madera; tiene 10 cm de ancho y 45 cm de largo, cuenta con cinco escalones de 7.5 cm de largo cada uno y 9 cm de ancho, la altura de cada escalón es de 2 cm. Las paredes internas fueron pintadas de color negro.

Diagrama 5 – Procedimiento experimental para evaluar el efecto ansiolítico



## 7. RESULTADOS

### 7.1 Certificación del material vegetal

El material vegetal se identificó como *Buddleja perfoliata* H.B.K. (Figura 5 y 6) con el número de registro 2397 el día 26 de agosto del 2014.

### 7.2 Optimización de las condiciones de extracción

Se varió el tiempo de extracción en intervalos de 2 horas, 3 horas y 24 horas, esperando que entre más tiempo estuviera el material vegetal en el proceso de extracción, mayor sería el rendimiento. También se varió la proporción de disolventes a emplear, siendo estos, etanol y agua destilada, donde las proporciones variadas fueron 2:1, 1:1 y 1:2 respectivamente.

En la tabla 1 se muestra el resultado de material extraíble promedio de 3 extractos a los tres diferentes tiempos y las 3 proporciones diferentes, a partir de 2g de material vegetal.

Tabla 1 – Resultados del diseño experimental para identificar las mejores condiciones de extracción

Proporción de disolventes etanol - agua	Tiempos de Extracción (horas)		
	2	3	24
1:2	0.679	0.678	0.705
1:1	0.624	0.647	0.692
2:1	0.631	0.639	0.687



Figura 5 – Espécimen herborizado y registrado ante el Herbario IZTA.  
(Fotografía por: Sergio Moreno. 2015. Facultad de Estudios Superiores I.)

HERBARIO IZTA	FLORA ÚTIL DE MEXICO	FES-IZTACALA
Nº REG. 2397	FAM.: LOGANIACEAE	
N.C.: <i>Buddleja</i>	<i>perfoliata</i>	H.B.K.
N.P.: Salvia de bolita		
EDO. Distrito Federal		
LOC.: Mercado Sonora		
TIPO DE VEG.:		
COORD.	y	ALT.: m.s.n.m
OBS.: Tesis Licenciado en Farmacia FES-C. "Actividad ansiolítica del extracto hidroalcohólico estandarizado de la planta Salvia de bolita ( <i>Buddleja perfoliata</i> H.B.K.) LOGANIACEAE en ratones albinos".		
COL. David Issac González Rodríguez		
Nº DE COL: s.n.	FECHA: 26 / Agosto / 2014	
DET.: Patricia Jácauez Ríos		
USOS: Medicinal (contra la tuberculosis y catarros).		

Figura 6 – Ficha obtenida del herbario IZTA.  
(Fotografía por: Sergio Moreno. 2015. Facultad de Estudios Superiores I.)

### 7.3 Estudio fitoquímico preliminar

Los resultados del estudio fitoquímico preliminar se muestran en la tabla 2. Todas las pruebas fueron realizadas con el mismo extracto, en el mismo día y con reactivos que fueron preparados al momento exclusivamente para ser usados en estas pruebas.

Tabla 2 – Resultados del tamizaje fitoquímico preliminar

Nombre de la prueba	Resultado
<b>Extracto</b>	
Baljet	( ++ )
Rosenthaler	( - )
Espuma	( +++ )
FeCl <sub>3</sub>	( +++ )
Gelatina	( + )
Grignard	( +++ )
Fehling	( +++ )
Ácido Silicotúngstico	( +++ )
Dragendorff	( +++ )
Hager	( + )
Shinoda	( +++ )
Amoniáco	( ++ )
<b>Fase orgánica</b>	
Shinoda	( - )
Bortränger	( - )
Baljet	( ++ )
<b>Fase acuosa</b>	
Bortränger	( - )
Liebermann	( ++ )

Los resultados se reportan de acuerdo a los criterios de Domínguez (1988):

- ( - ) indica resultado negativo
- ( +/- ) dudoso.
- ( + ) indica resultado escaso
- ( ++ ) indica resultado moderado
- ( +++ ) abundante

## 7.4 Selección del estándar para la cuantificación

En la tabla 3, se muestran los Rf obtenidos de las muestras de rutina, naringina, quercetina, hesperidina y el extracto hidroalcohólico.

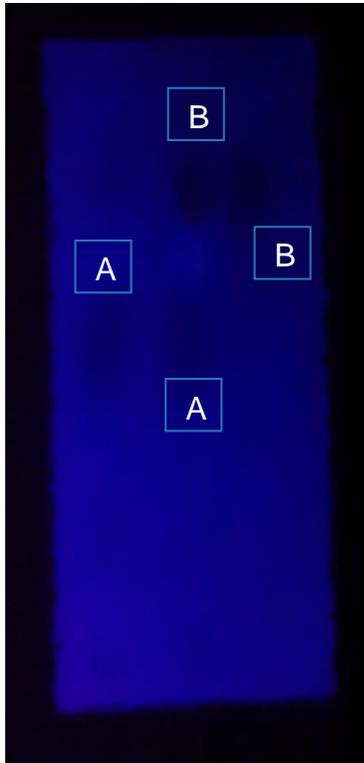
Tabla 3 – Valores de Rf para los estándares de flavonoides y extracto.

Muestra	Rf
Rutina	0.68
Naringina	0.14
Quercetina	0.93
Hesperidina	0.29
Extracto	0.38, 0.69, 0.75, 0.92

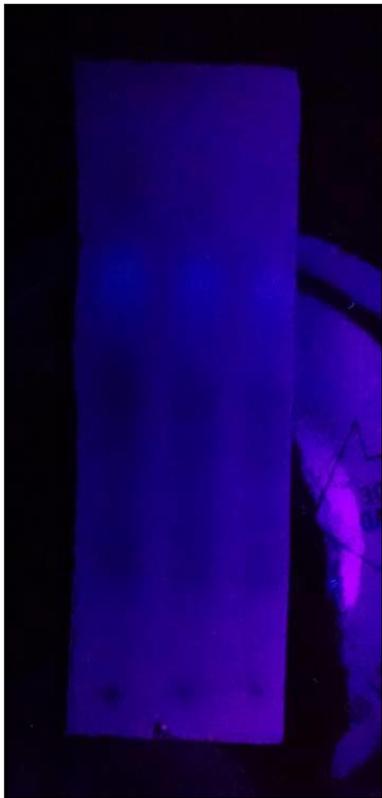
Como se puede apreciar en la tabla 3 y la figura 7, la quercetina y la rutina presentaron valores de Rf muy similares a dos de los cuatro puntos del extracto, por lo que fueron seleccionados como candidatos para la cuantificación.

También se realizó una corrida cromatográfica, para identificar si el método de extracción (microondas, maceración y expresión [por Potter]) fomentaba alguna variación sobre los componentes que se podían observar en la placa cromatográfica, sin embargo, no se apreció ninguna diferencia aparente (Figura 8).

Durante el desarrollo de esta etapa del experimento, se notó que el extracto, se descomponía relativamente de forma rápida, pues se comenzaba a apreciar una banda café oscuro con un Rf aproximado de 0.4, lo cual los resultados que se observaban en las placas, por lo que todos los extractos analizados fueron frescos. Como se observa en las figuras 9 y 10, el extracto obtenido de salvia de bolita no es muy estable, en la placa cromatográfica se nota que con el tiempo aparecían otros componentes a diferencia del extracto recién preparado, también se apreció que, con el tiempo, precipitaban cristales, los cuales tenían un punto de fusión  $\geq 300^{\circ}\text{C}$ . En las figuras 9 y 10 se puede observar la forma en la que se descomponía el extracto.



*Figura 7 – Izquierda: Estándar de rutina (A). Centro: Extracto hidrolacohólico. Derecha: Estándar de Quercetina (B).*



*Figura 8 – Placa cromatográfica de extractos de salvia de bolita. De izquierda a derecha: 1) Extracción por microondas. 2) Extracción por maceración. 3) Extracción por expresión.*



Figura 9 – Extracto hidroalcohólico preparado por maceración y revelado con yodo 0, 24 y 48 horas después de su preparación.

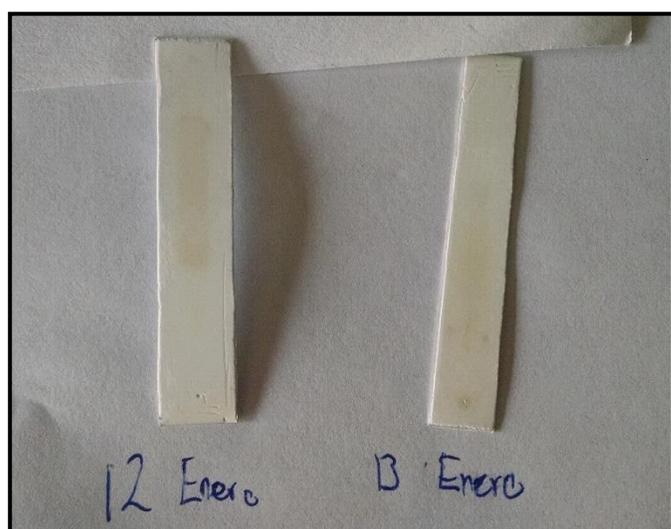


Figura 10– Extracto hidroalcohólico sin revelar. Placa izquierda: Control. Placa derecha: Extracto aplicado 24 horas después de aplicar el control.

Con base a la figura 7, se determinó que tanto la rutina y la quercetina podían ser utilizadas para la cuantificación, sin embargo, se eligió rutina por tener una mayor cantidad de esta sustancia disponible en el laboratorio.

### 7.5 Cuantificación de flavonoides

Para cuantificar flavonoides, se realizó una curva de calibración con rutina utilizando el método descrito en la sección 7.8 (diagrama 4), pero en vez de extracto, se utilizó estándar de rutina. Los sistemas se prepararon a partir de una solución stock de rutina con una concentración de 957.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En la tabla 4 se detalla la preparación de la curva de calibración.

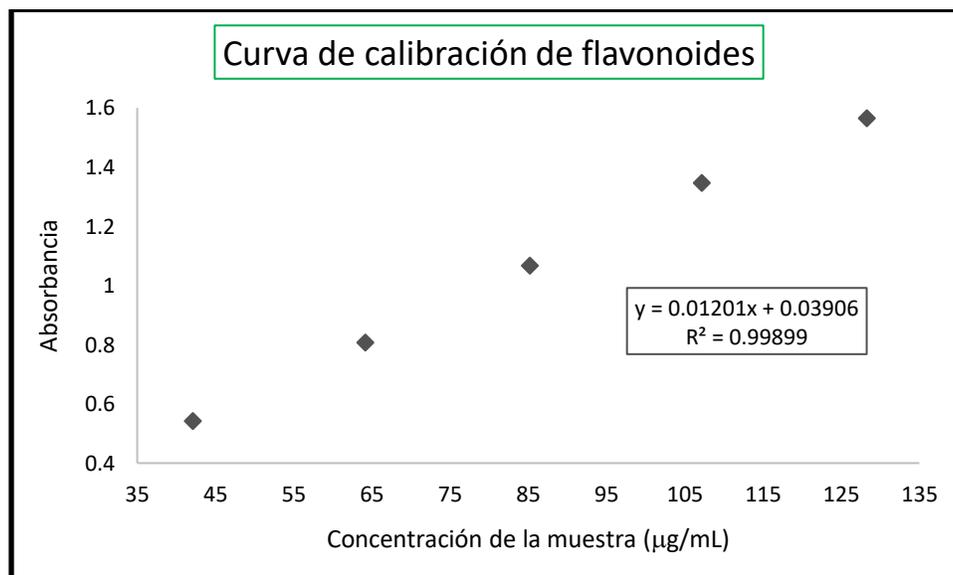
La curva de calibración (gráfica 1) presentó un valor de  $R^2 \sim 0.9990$  y un %CV de 1.8355. Los resultados a detalle se muestran en la tabla 5.

Tabla 4 – Preparación de la curva de calibración

Preparación Muestra	mL de rutina	NaNO <sub>2</sub> 10% (mL)	Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> 10% (mL)	NaOH 5% (mL)	Aforo (mL)
<b>Blanco</b>	0	0.6	0.5	3	10
<b>Mta 1</b>	0.44	0.6	0.5	3	10
<b>Mta 2</b>	0.67	0.6	0.5	3	10
<b>Mta 3</b>	0.89	0.6	0.5	3	10
<b>Mta 4</b>	1.12	0.6	0.5	3	10
<b>Mta 5</b>	1.34	0.6	0.5	3	10

Tabla 5 – Resultados de la curva de calibración de rutina

Concentración de la muestra (µg/mL)	Abosrbancia (λ=508nm)	Abs / [Muestra]
42.134	0.541	0.01283
64.159	0.807	0.01257
85.226	1.066	0.01250
107.213	1.347	0.01256
128.3284	1.565	0.01219
	Promedio=	0.012537016
	STD=	0.000230126
	%CV=	1.8355



Gráfica 1 – Curva de calibración de rutina.

Posteriormente, para identificar el mejor método de extracción, se cuantificaron tres extractos obtenidos mediante extracción asistida por microondas (muestras MAM1, MAM2 y MAM3) y maceración (muestras MAC1, MAC2 y MAC3). La preparación de los extractos se describe en los diagramas 2 y 3, los extractos se obtuvieron a partir de 1g de salvia de bolita utilizando 100mL de la mezcla de disolventes y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6. La extracción por microondas se hizo a una temperatura promedio de 54°C.

Las concentraciones (en µg/mL) de la muestra analítica se calculan con base a la ecuación de la recta de la curva de calibración (gráfica 1) y con la ecuación 1.

$$\text{Concentración de la mta analítica (CMA)} = \frac{\text{Abs}}{0.01201} - 0.03906$$

*Ecuación 1 – Cálculo de concentración de mta analítica*

La cantidad de flavonoides en el extracto se calculó con las ecuaciones 2 y 3.

$$\text{mg de flavonoides en mta analítica} = \text{CMA} \left( \frac{1\text{mg}}{1000\mu\text{g}} \right) (10\text{mL})$$

*Ecuación 2 – Cálculo de flavonoides en la muestra analítica*

$$\text{Flavonoides totales del extracto} = \frac{\text{mg de flavonoides mta} \times \text{peso del extracto}}{\text{mg de mta analítica}}$$

*Ecuación 3 – Cálculo de flavonoides presentes en el extracto*

Tabla 6 – Resultados de cuantificación al extraer por maceración y microondas.

Muestra	Salvia pesada (g)	Material extraído (mg)	Muestra analítica (mg)	Absorbancia de la MA	Flavonoides en la muestra (mg)
MAC1	1.0219	179.0	3.1	1.469	70.6043
MAC2	1.0202	186.5	3.1	1.358	68.0023
MAC3	1.0157	173.5	3.1	1.570	73.1416
MAM1	1.0020	204.7	3.8	1.657	74.3003
MAM2	1.0054	195.2	3.5	1.795	83.3335
MAM3	1.0028	209.9	3.4	1.508	77.4920

Cantidad de flavonoides promedio al extraer por maceración: 70.5828 mg

Cantidad de flavonoides promedio al extraer por microondas: 78.3753 mg

Utilizando la ecuación 4, se puede determinar la cantidad de flavonoides estimada por gramo de extracto, teniendo así una cantidad promedio de 385.5787mg/g de flavonoides.

$$\text{Flavonoides(g) de extracto} = \frac{\text{mg de flavonoides totales} \times 1\text{g de extracto}}{\text{mg de mta de extracto}}$$

*Ecuación 4 – Cálculo de flavonoides por gramo de extracto.*

## 7.6 Evaluación farmacológica

En las tablas siguientes, se muestran los resultados resumidos de las pruebas de plus-maze (tablas 7, 8 y 9), escalera (tablas 10, 11 y 12) y tracción (tablas 13, 14 y 15).

### 7.6.1 – Resultados de prueba de Plus-Maze

El análisis ANOVA para el %EBA, %PBA y número de bolos, entre los ratones administrados con Diazepam (D=0.5 mg/Kg), y los administrados con quercetina y el extracto, indica que no existen diferencias significativas entre los resultados ( $P>0.05$ ), sugiriendo que tanto la quercetina como el extracto, muestran un efecto ansiolítico comparable al del Diazepam, sin embargo, es importante notar que la quercetina tiene una tendencia a tener un efecto mayor, mientras que la dosis de extracto de 400 mg/Kg muestra en general un comportamiento similar a la dosis de 0.5 mg/Kg de Diazepam.

El análisis ANOVA para el número de estiramientos entre el lote de Dizepam (D=0.5 mg/Kg) y el lote de extracto, indica que hay diferencias significativas ( $P<0.05$ ) en las dosis de 200 mg/Kg ( $P<0.05$  [\*]) y 400 mg/Kg ( $P<0.01$  [\*\*]).

Tabla 7 – Tabla de datos resumidos de la prueba de plus-maze de ratones administrados con extracto

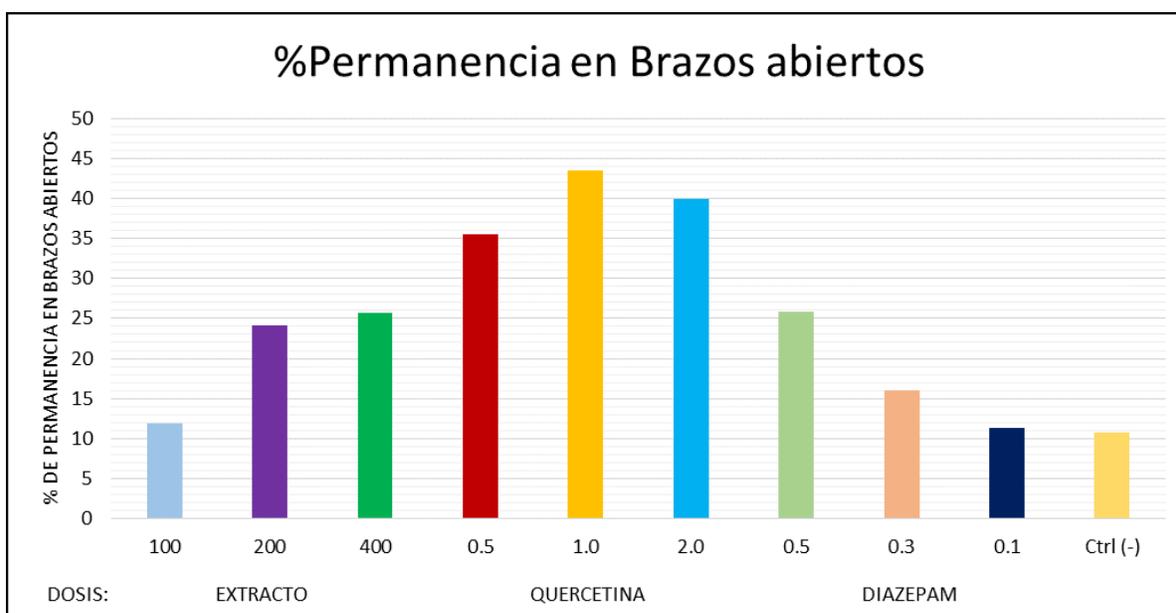
EXTRACTO									
Dosis (mg/Kg)	t brazos cerrado (seg)	t brazos abiertos (seg)	t centro (seg)	Entradas BA	Entradas BC	Bolos	Estiramientos	%PBA	%EBA
<b>100</b>	225.6	30.2	44.2	1.6	6.4	0.5	2.4	11.9319	20.7738
<b>200</b>	198	66.2	35.8	1.3	3.1	0.5	1.3	24.1634	38.8175
<b>400</b>	211.1	74.1	14.8	1.3	2.4	0.8	0.6	25.7651	44.1905

Tabla 8 - Tabla de datos resumidos de la prueba de plus-maze de ratones administrados con quercetina

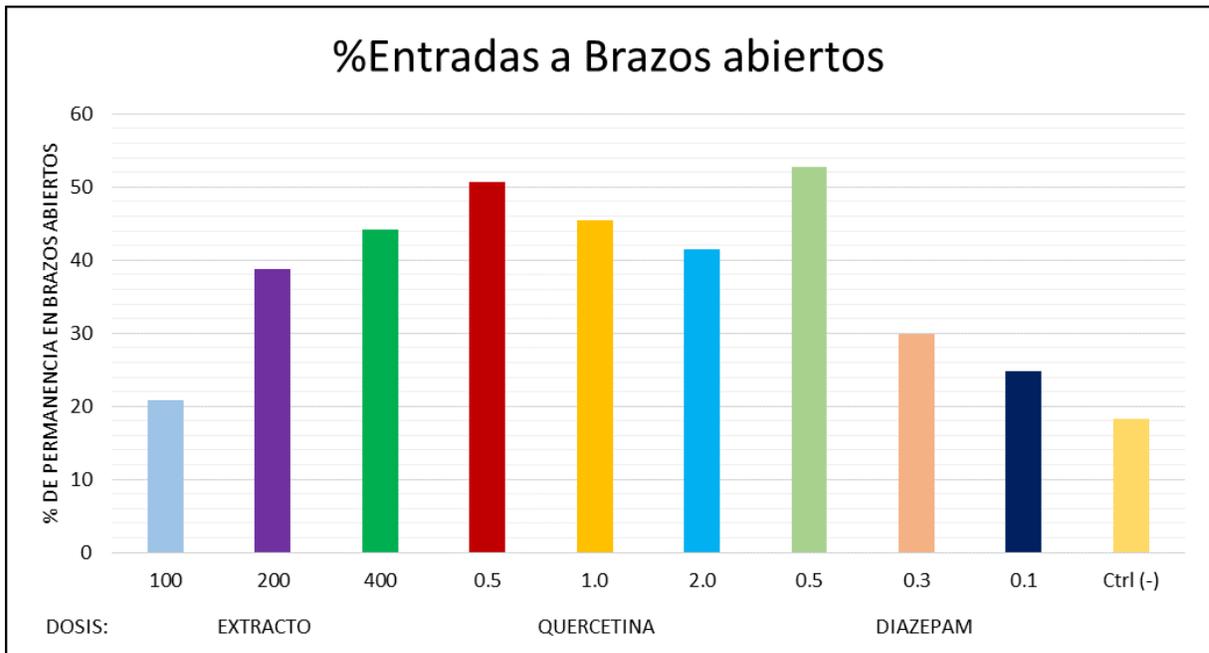
QUERCETINA									
Dosis (mg/Kg)	t brazos cerrado (seg)	t brazos abiertos (seg)	t centro (seg)	Entradas BA	Entradas BC	Bolos	Estiramientos	%PBA	%EBA
<b>0.5</b>	165.3	97.9	36.8	1.4	3.2	0.5	2.2	35.5162	50.6667
<b>1.0</b>	139.2	123.9	36.9	1.4	4.1	0.2	2.8	43.4986	45.4722
<b>2.0</b>	147.7	109.6	42.7	1.6	4.5	0.3	3.7	39.9795	41.5357

Tabla 9 - Tabla de datos resumidos de la prueba de plus-maze de ratones control y administrados con Diazepam

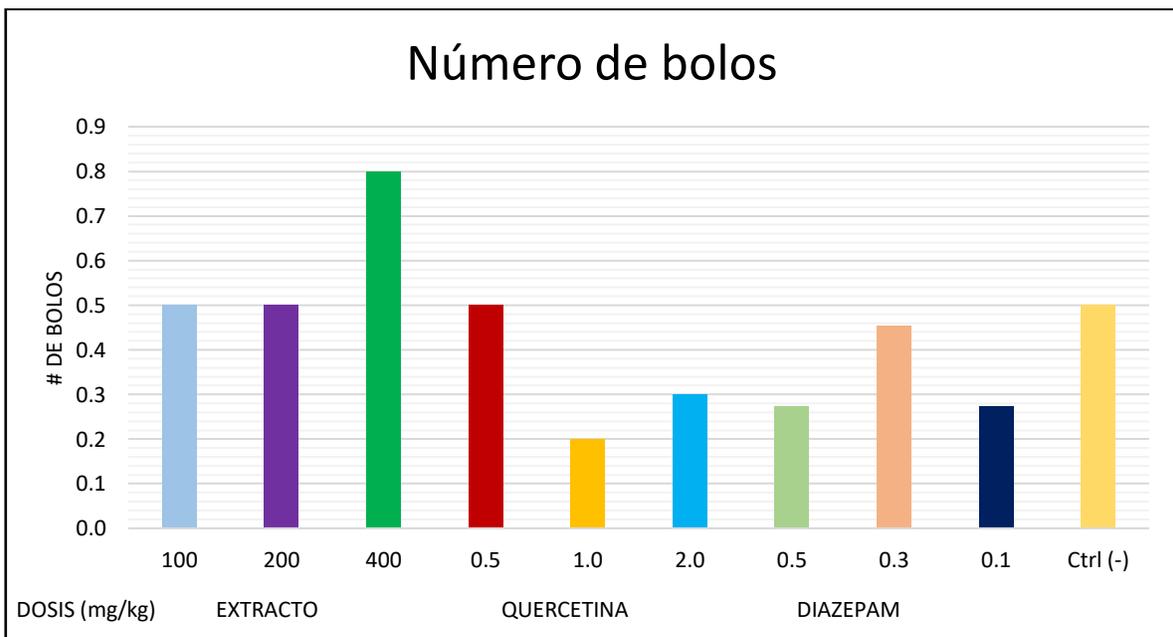
DIAZEPAM Y CONTROL NEGATIVO									
Dosis (mg/Kg)	t brazos cerrado (seg)	t brazos abierto (seg)	t centro (seg)	Entradas BA	Entradas BC	Bolos	Estiramientos	%PBA	%EBA
<b>0.5</b>	203.0000	75.545	21.4545	1.0909	3.6364	0.2727	4.5455	25.8054	52.7622
<b>0.3</b>	223.4545	42.0909	34.4545	2.2727	5.0909	0.4545	4.8182	15.9813	29.9423
<b>0.1</b>	219.7273	26.8182	53.4545	1.3636	4.9091	0.2727	5.3636	11.3654	24.7835
<b>Ctrl (-)</b>	252.1667	30.8333	17.0000	1.5000	7.0000	0.5000	4.8333	10.8094	18.3405



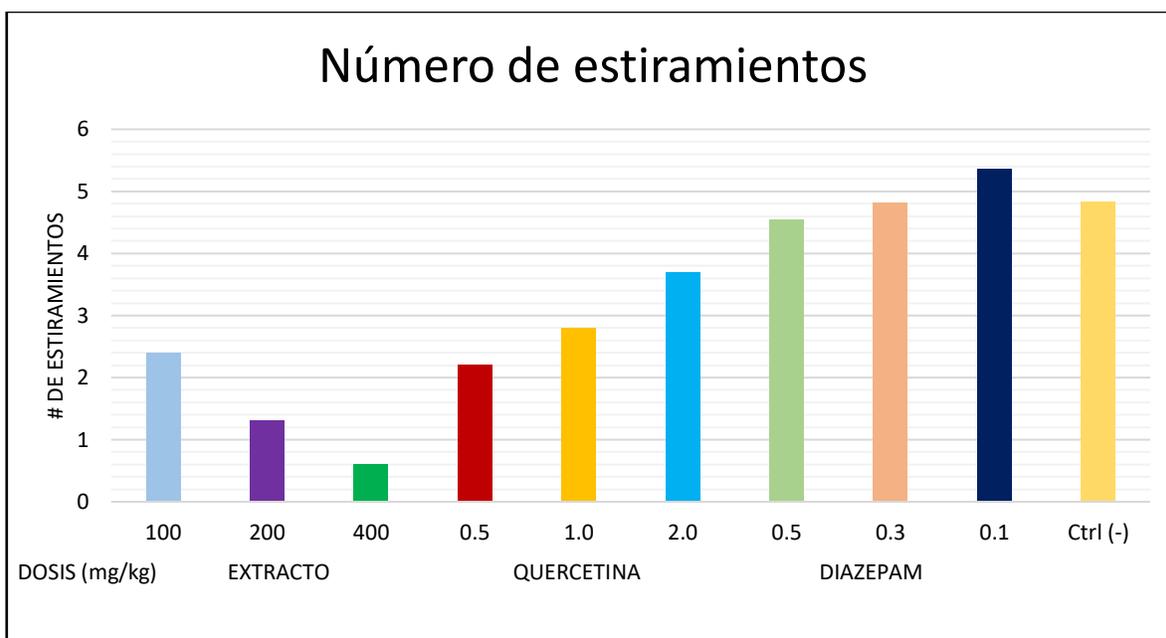
Gráfica 2 – Porcentajes de PBA promedio en modelo de Plus-Maze



Gráfica 3 – Porcentajes de EBA promedio en modelo de Plus-Maze



Gráfica 4 – Número de bolos promedio en modelo de Plus-Maze



Gráfica 5 – Número de estiramientos promedio en modelo de Pluz-Maze

#### 7.6.2. Resultados de prueba de escalera

En este caso, el análisis ANOVA muestra que no existen diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) para el número de escalones recorridos con respecto al Diazepam ( $D = 0.05$  mg/Kg), lo que sugiere que el número de escalones recorridos por los ratones administrados con las otras sustancias es similar al de un fármaco ansiolítico.

El análisis ANOVA del número de bolos indica que la variación entre los resultados es significativa ( $P < 0.025$ ), mientras que el ANOVA del número de estiramientos indica que hay diferencias extremadamente significativas ( $P < 0.001$ , \*\*\*) entre la dosis de Diazepam 0.5 mg/Kg y la de 400 mg/Kg de extracto.

Tabla 10 – Tablas de datos resumidos de la prueba de Escalera de ratones administrados con Extracto

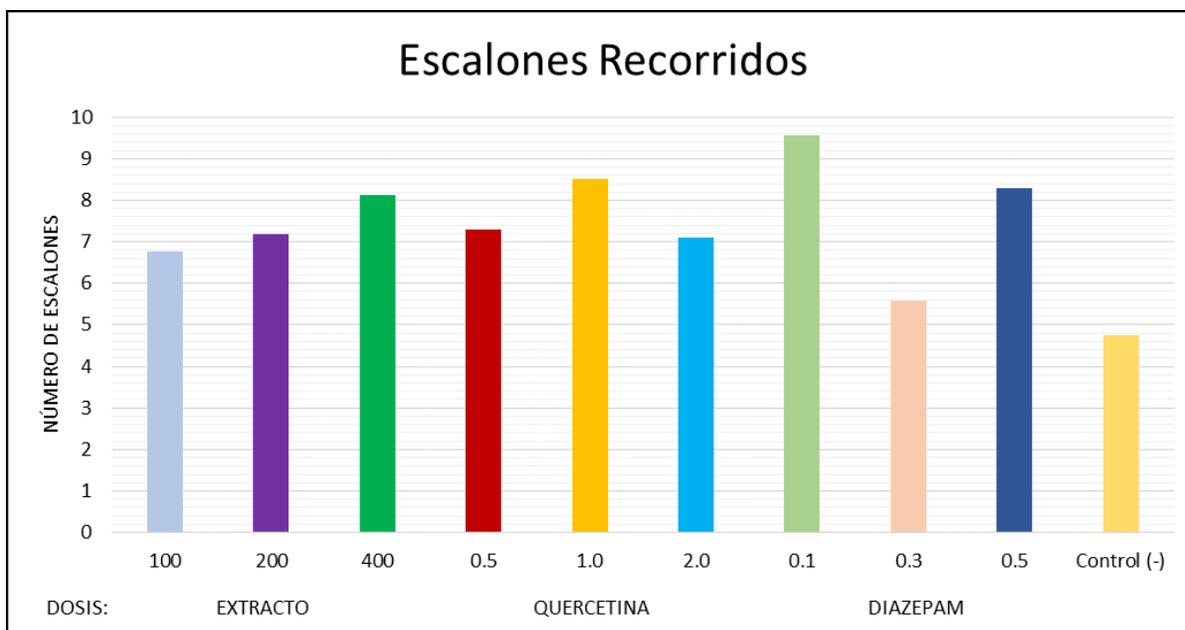
EXTRACTO						
Dosis (mg/Kg)	Avance	Retroceso	Escalón Final	Escalones Recorridos	Bolos	Estiramientos
<b>100</b>	3.4706	3.2941	1.4706	6.7647	1.0588	3.6471
<b>200</b>	3.9412	3.2353	1.2941	7.1765	0.5294	1.8235
<b>400</b>	4.4706	3.6471	1.0588	8.1176	0.1765	0.6471

Tabla 11 - Tablas de datos resumidos de la prueba de Escalera de ratones administrados con Quercetina

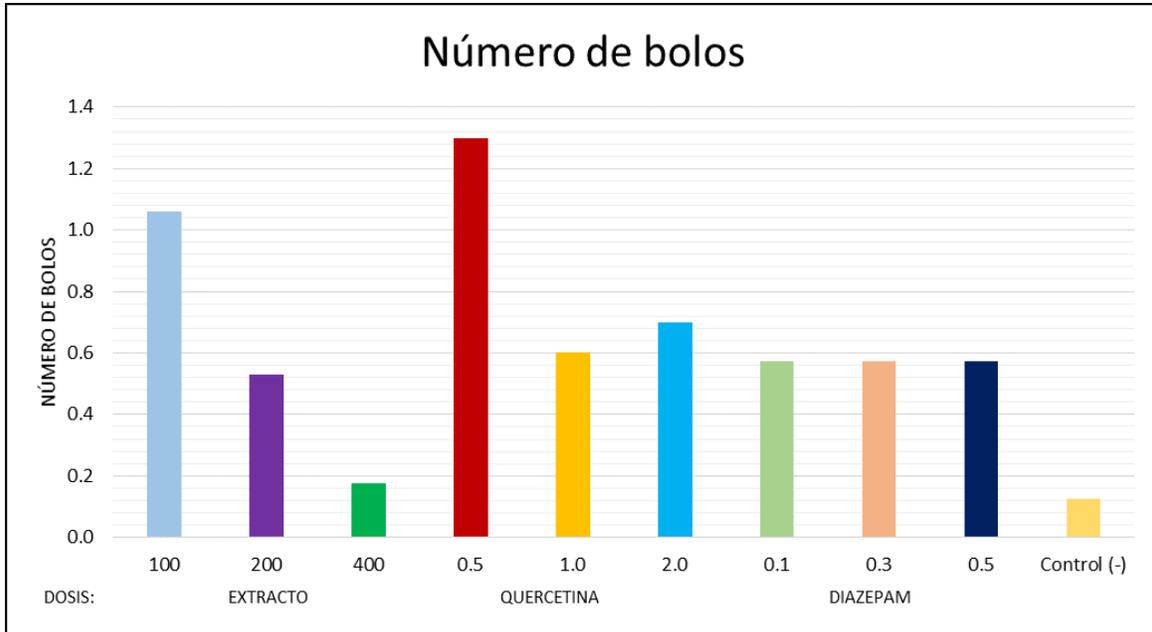
QUERCETINA						
Dosis (mg/Kg)	Avance	Retroceso	Escalón Final	Escalones Recorridos	Bolos	Estiramientos
<b>0.5</b>	3.8	3.5	1.8	7.3	1.3	4.9
<b>1.0</b>	4.5	4.0	2.1	8.5	0.6	3.8
<b>2.0</b>	3.8	3.3	2.1	7.1	0.7	4.0

Tabla 12 - Tablas de datos resumidos de la prueba de Escalera de ratones control y administrados con diazepam

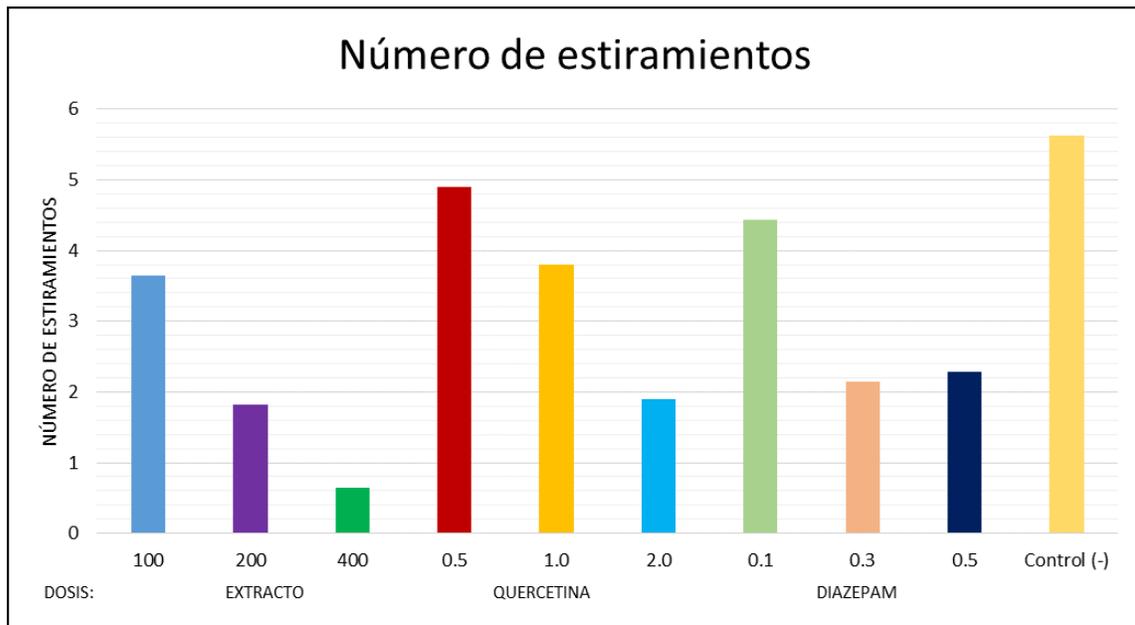
DIAZEPAM Y CONTROL NEGATIVO						
Dosis (mg/Kg)	Avance	Retroceso	Escalón Final	Escalones Recorridos	Bolos	Estiramientos
<b>0.1</b>	5.0000	4.5714	1.8571	9.5714	0.5714	2.2857
<b>0.3</b>	3.0000	2.5714	1.5714	5.5714	0.5714	2.1429
<b>0.5</b>	4.4286	3.8571	1.8571	8.2857	0.5714	4.4286
<b>Control (-)</b>	5.000	4.5714	1.8750	4.7500	0.1250	5.6250



Gráfica 6 – Número de escalones explorados promedio



Gráfica 7 – Número de bolos excretados promedio



Gráfica 8 – Número de estiramientos promedio

### 7.6.3 Resultados de la prueba de tracción

El análisis ANOVA sugiere que existen diferencias significativas entre los resultados de % de relajación del Diazepam (D=0.5 mg/Kg) y los que se obtuvieron del extracto D=100 mg/Kg (P<0.01 [\*\*]), extracto D=200 mg/Kg (P<0.05 [\*]) y quercetina D=2.0 mg/Kg (P<0.01 [\*\*]).

Tabla 13 – Tablas de datos resumidos de la prueba de tracción de ratones administrados con extracto

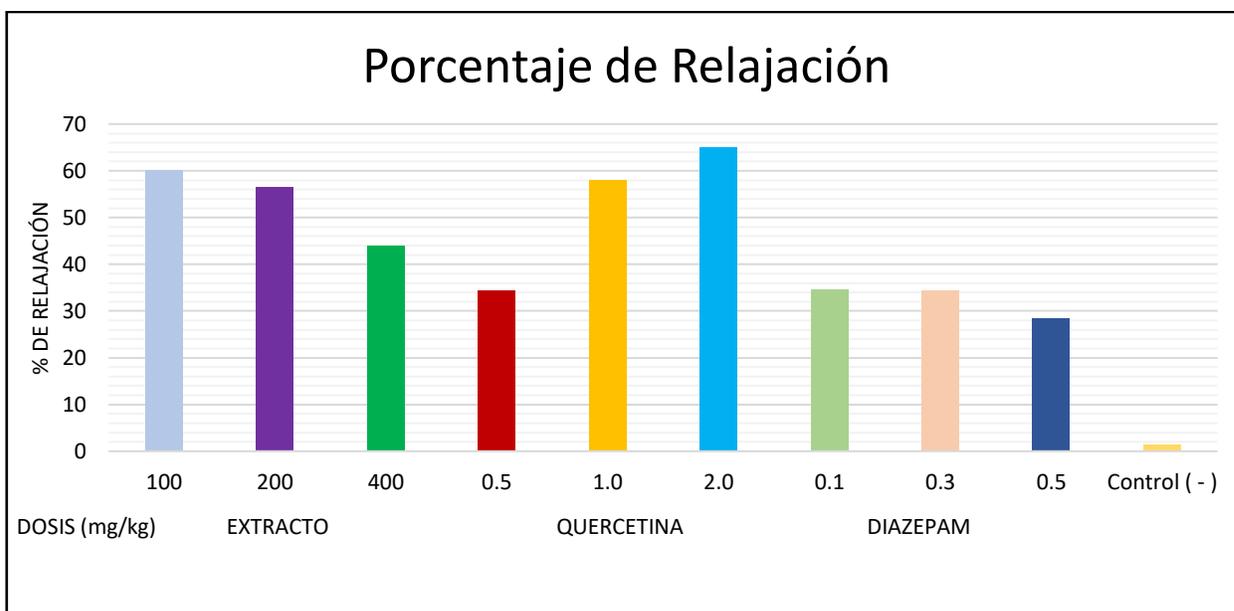
EXTRACTO				
Dosis (Mg/Kg)	Tiempo inicial prom. (seg)	Tiempo final prom. (seg)	Tf-Ti (seg)	% de relajación
<b>100</b>	3.0973	9.1176	6.0204	25.9008
<b>200</b>	3.1371	8.7843	5.6473	25.9104
<b>400</b>	4.9016	9.2941	4.3925	33.1804

Tabla 14 – Tabla de datos resumidos de la prueba de tracción de ratones administrados con quercetina

QUERCETINA				
Dosis (mg/Kg)	Tiempo inicial prom. (seg)	Tiempo final prom. (seg)	Tf-Ti (seg)	% de relajación
<b>0.5</b>	3.0990	6.5330	3.4340	34.34
<b>1.0</b>	2.9990	8.7967	5.7977	57.9766
<b>2.0</b>	2.3650	8.8660	6.5010	65.0100

Tabla 15 – Tabla de datos resumidos de la prueba de tracción de ratones control y administrados con diazepam

DIAZEPAM Y CONTROL NEGATIVO				
Dosis (mg/Kg)	Tiempo inicial prom. (seg)	Tiempo final prom. (seg)	Tf-Ti (seg)	% de relajación
<b>0.1</b>	3.2118	6.6667	3.4548	34.5484
<b>0.3</b>	3.0239	6.4618	3.4379	34.3787
<b>0.5</b>	4.5145	7.3627	2.8482	28.4818
<b>Control (-)</b>	2.0492	2.1785	0.1292	1.2923



Gráfica 9 – Porcentajes de relajación del modelo de tracción

## 8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Toda investigación con plantas medicinales requiere de especificar la calidad del material vegetal con información como el lugar de procedencia, compra en algún lugar, entre otros; de igual manera se requiere conocer el modo de preparación, todo ello debido a que los estudios realizados en ella, puedan ser corroborados por otros investigadores (Villar, 2016), es por ello que la salvia de bolita se identificó en el Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, obteniendo el registro #2397.

Cuando se desea realizar una evaluación fitofarmacológica al extracto de una planta, también es de importancia considerar el tipo de disolvente que se empleará para la prueba, pues se debe asegurar que el disolvente empleado no interfiera con la respuesta farmacológica a evaluar. Una posible forma de demostrar que el disolvente no interfiere con las pruebas, es evaluando igualmente un lote control de ratones al cual se le administren cantidades adecuadas del disolvente empleado. Con esto en mente, únicamente se decidió utilizar la fracción hidrosoluble de un extracto hidroalcohólico.

El estudio fitoquímico preliminar indica que tentativamente, el extracto hidroalcohólico contiene agrupamientos lactónicos, saponinas, fenoles, taninos, glucósidos cianogénicos, flavonoides, azúcares reductores, triterpenos y esteroides. Estos resultados están parcialmente en acorde con el estudio de Avila Acevedo en 2002, quien encontró que la planta contiene predominantemente verbascósido y

linarina, este mismo estudio indica que el aceite esencial de esta planta se compone casi exclusivamente de  $\alpha$ -pineno. Ávila (2002) en su estudio menciona que no se aisló ninguna saponina, y que sea probable que la especie no realice la síntesis de este tipo de compuestos, lo cual entra en contradicción con los resultados de nuestro estudio preliminar.

Para proceder a la optimización del extracto y su evaluación farmacológica, se tenía que cuantificar al mismo, para esto, se seleccionó una técnica que se basa en el uso de  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  y  $\text{NaOH}$  y en la sustitución 3',4'-dihidroxi (Figura 11), molécula b) de la mayoría de los flavonoides. El ion aluminio se une al oxígeno de la posición 4' y forma un quelato color rojo en medio alcalino. Hongbin realizó la propuesta mecanística, la cual se muestra en la figura 11.

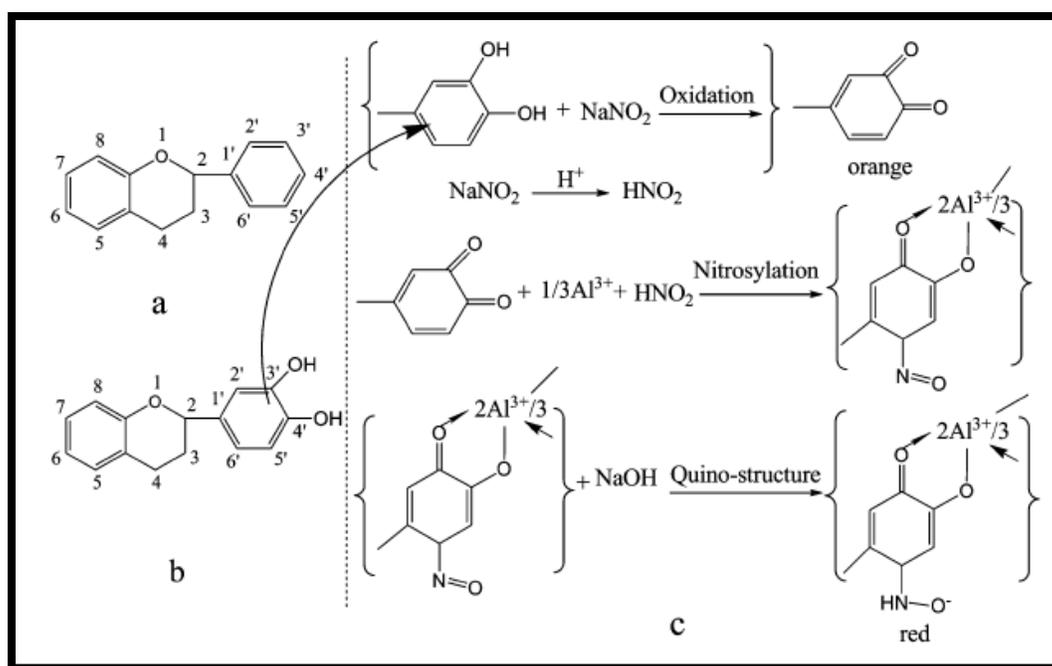


Figura 11 – Propuesta mecanística de Zhu Hongbin (2010). a) Estructura básica de los flavonoides. b) Flavonoide con sustituciones 3',4'-dihidroxi. c) Formación del complejo de coordinación con aluminio en medio básico.

La curva de calibración cumple con los parámetros de calidad de la Guía de Validación de Métodos Analíticos (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A.C., 2000), pues presenta un valor de  $R^2=0.9989$ , y el %CV de ésta es menor al mínimo requerido de 5.0% para métodos con muestras biológicas, e inclusive se logró un valor menor a 2.0%, el cual se requiere para métodos volumétricos, espectrofotométricos y cromatográficos, lo cual sugiere que este método podría ser adaptado a diferentes tipos de análisis y conservar poder predictivo. Adicionalmente, se evaluó la precisión y linealidad del método con las mismas muestras que fueron cuantificadas, pues las seis muestras se prepararon

de forma independiente e inclusive por métodos de extracción diferentes y el %CV de estas muestras fue de 0.2%, que es menor al 2.0% (3.0% para muestras biológicas) y 1.5% requerido para las pruebas de precisión, y linealidad respectivamente. Si bien estos parámetros dan relativa confianza de la cuantificación, el método requiere todavía más pruebas para ser validado.

Se observó que la extracción por microondas presenta un mayor rendimiento de flavonoides que la extracción por maceración, lo cual se fundamenta en que al generar una mayor ruptura de células, el material extraíble se incrementa, con la ventaja de que se puede hacer en mucho menor tiempo. Es importante considerar que la extracción por microondas puede descomponer algunos compuestos, o fomentar la volatilización de los mismos si no se trabaja con precaución (Anup, Vivekananda, & Subhash, 2015). Sin embargo, la cromatografía en capa fina que se realizó, que bien no puede considerarse como una prueba confirmatoria, sugiere que este no es el caso.

Se obtuvo un valor curiosamente elevado de flavonoides, en primera instancia, se creía que simplemente la salvia de bolita era muy rica en flavonoides, ya que se conocen plantas que contienen casi el 30% de flavonoides en su extracto, como es el caso del *Ginkgo biloba* (Keller B., 2009), sin embargo, para detectar desviaciones en el método, se decidió poner a prueba dos sustancias más bajo este tratamiento, que en este caso fueron ácido gálico y ácido ascórbico. Estas sustancias se trataron de la misma forma en la que se trató a la muestra, con la excepción de que el ácido ascórbico se protegió de la luz durante el experimento. Ambas sustancias mostraron absorbancia de la luz visible a una  $\lambda=518\text{nm}$  para el ácido ascórbico, y  $494\text{nm}$  para el ácido gálico, lo cual nos lleva a pensar que el método realmente carece de especificidad hacia los flavonoides, y en vez reaccionan todos los metabolitos reductores, que, en nuestro caso, equivalen a  $385.57\text{mg/g}$  de extracto.

En la evaluación farmacológica, con el modelo de plus-maze (graficas 2, 3, 4 y 5), se observó que el efecto ansiolítico del extracto y diazepam eran semejantes, pues ambos fueron dosis dependientes. Es probable que las sustancias responsables del efecto ansiolítico en el extracto sean los flavonoides, incluso el núcleo flavona posee propiedades ansiolíticas sin presencia de relajación. El mecanismo de acción de flavonoides lo reporta Fernández y cols. (2003) quienes sugieren que éstos compiten por el receptor  $\text{GABA}_A$ , regulando por lo tanto el flujo de iones  $\text{Cl}^-$  en el SNC, sin embargo, los flavonoides glicosilados no interactúan de forma directa con  $\text{GABA}_A$ , sino que se cree que éstos al metabolizarse, se convierten en un flavonoide libre con afinidad a  $\text{GABA}_A$ . Esta idea se fortalece si consideramos el estudio realizado por Zhen Ou-yang (2013), donde realizan el estudio farmacocinético de la rutina, la cual, en un paso, pierde la rutinosa para convertirse en quercetina.

Estudios de Johnston y cols. (2006), demuestran que la linarina también genera un efecto ansiolítico por interacción con  $\text{GABA}_A$ ; otros estudios sugieren que la relajación muscular se puede justificar por la presencia de la linarina, la cual también

se ha demostrado que tiene cierto efecto sedante e hipnótico (Fernández , Wasowski, Paladini, & Marder, 2003); si consideramos que el género *Buddleja* presenta una gran cantidad de linarina, y que el extracto de la salvia de bolita generó un efecto ansiolítico, se puede plantear la hipótesis de que parte del efecto del extracto en el SNC puede tener relación con esta sustancia, sin embargo, se requieren más estudios que profundicen y logren confirmar esto, pues en el presente estudio no se evaluó farmacológica, ni químicamente a la linarina. Por lo tanto, se podría asumir que la rutina, o la quercetina, o la linarina, o algún otro compuesto del que no se tiene conocimiento que esté presente en el extracto, o las interacciones de ellos entre sí, generaron el efecto ansiolítico.

En cuanto a la quercetina, en donde los valores obtenidos con el modelo de plus - maze fueron muy variables, se cree, se debe a que de acuerdo a Vissiennon y colaboradores (2012), esta posee un efecto de “vuelta en U”, debido a que la concentración de quercetina en el intestino delgado comienza a favorecer que ésta sea absorbida sin ser metabolizada, lo cual se afirmó mediante el modelo de escalera, en donde el efecto ansiolítico se observa con la disminución de las paradas y limpieza, en la tabla 7 se obtuvo dicha disminución (Cardenas, 2002).

Con base a estos resultados, se puede considerar que la dosis ansiolítica efectiva de la fracción hidrosoluble del extracto hidroalcohólico de la salvia de bolita es de 400mg/Kg. Si consideramos por lo tanto que esta dosis es la responsable del efecto, y que, en promedio, el extracto seco posee aproximadamente 385.57mg/g de metabolitos reductores, podemos hacer la estimación de la dosis ansiolítica efectiva (DAE) de los metabolitos equivalentes de rutina (ER) equivalentes a rutina (ecuación 4).

*Ecuación 4 – Cálculo para estimar la DAE de flavonoides*

$$DAE_{ER} = \frac{400mg \text{ extracto}}{Kg} \left( \frac{1g}{1000mg} \right) \left( \frac{385.57mg \text{ ER}}{1g \text{ extracto}} \right) = \frac{154.228mg}{Kg}$$

---

## 9. CONCLUSIONES

Del presente trabajo, se llegaron a las siguientes conclusiones:

- Se logró identificar a la planta salvia de bolita (*Buddleja perfoliata* H. B. K) en el Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, quedando una muestra de herbario como prueba de su identificación.
- Por medio de un tamizaje fitoquímico se encontró que los grupos metabólicos que se encuentran en la planta son lactonas, azúcares reductores, saponinas, fenoles, taninos, glúcósidos cianogénicos, flavonoides, triterpenos y esteroides.
- Se determinó que los extractos hidroalcohólicos de Salvia de bolita. Contienen en promedio 385.57mg de equivalentes de rutina, se encontró que a la dosis efectiva de 400 mg/Kg de extracto, se encuentran aproximadamente 154.228 mg de equivalentes de rutina.
- El extracto de *Buddleja perfoliata* H.B.K. presenta efecto ansiolítico, siendo dosis dependiente, de la misma manera se encontró que el efecto relajante disminuye conforme se aumenta la dosis y no se presenta efecto sedante o hipnótico.
- La investigación bibliográfica realizada es indicativa a que el ansiolítico es atribuido en parte a la quercetina, algunos metabolitos característicos del género *Buddleja*, o en su defecto, a la combinación de estos.

---

## 10. PROSPECTIVAS

A continuación, se presentan las prospectivas de este trabajo, las cuales se presentan en una forma cronológica sugerida.

- Dada la versatilidad de los componentes que presenta la *Buddleja perfoliata* H.B.K., se propone que se caracterice y evalúe farmacológicamente el aceite esencial de ésta.
- Estudiar la interacción farmacológica que presentan el extracto cuando se consumen medicamentos prescritos para tratar la ansiedad, estrés, etc.
- Hacer la validación completa del método analítico y buscar uno más que sea preciso a los flavonoides.
- Una vez lograda la validación del método analítico, y caracterizado con mayor profundidad el extracto o el aceite esencial, se propone estandarizar el proceso de extracción.
- Explorar las posibles aplicaciones industriales que pueda tener la Salvia de bolita, pues el verbascósido y la linarina presentan efectos muy variados que pueden utilizarse para la prevención de algunas enfermedades del SNC.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Alipieva, K., Korkina, L., Orhan, I. E., & Gergiev, M. I. (Noviembre de 2014). Verbascoside- A Review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1065-10176.
2. Anup , K., Vivekananda, M., & Subhash, C. (2015). *Essentials of Botanical Extraction*. Academic Press.
3. Avila Acevedo, J. G. (2002). *Estudio Fitoquímica de Buddleja Perfoliata y Buddleja scordiodes. Evaluación de la actividad antibacteriana y foto protectora de sus principales metabolitos secundarios*. Distrito Federal, México: Posgrado UNAM.
4. Berenzon Gorn, S., Alanís Navarro, S., & Saavedra Solano, N. (2009). El uso de las terapias alternativas y complementarias en población mexicana con trastornos depresivos y de ansiedad: Resultados de una encuesta en la Ciudad de México. *Salud Mental*, 107-115.
5. *Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana*. (2009). Recuperado el 16 de Diciembre de 2015, de Universidad Nacional Autónoma de México: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Buddleja%20perfoliata&id=7476>
6. Biopsychology Laboratory. (2015). An elevated plus maze is equipped with a video tracking system from Biobserve. Nebraska, EEUU América. Recuperado el 15 de Marzo de 2016, de <http://psychology.unl.edu/biopsy/equipment>
7. Boissier, J. R., Dremont, C., Robins, R., & Pagny, J. (1961). Tentative de pharmacologie prévisionnelle dans le domain des neuroleptiques: actions sedative centrale et adrenolytique de la N(dimethoxy-3,4 phenetyl)N'(chloro-2 phenyl) piperazine. *Int. Pharmacodyn. Ther.*, 133, 29-32.
8. COFEPRIS decomosió 2.15 millones de productos milagro. (29 de Diciembre de 2015). *El Economista*. Recuperado el 12 de Enero de 2016, de <http://eleconomista.com.mx/industrias/2015/12/29/cofepris-decomiso-215-millones-productos-milagro>
9. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A.C. (2000). *Guía de Validación de Métodos Analíticos*. Ciudad de México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A.C.
10. D'Andrea, G. (2015). Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, 106, 266.
11. Dangles, O., Dufour, C., Manach, C., Morand, C., & Remesy, C. (2001). Binding of flavonoides to plasma proteins. *Methods in Enzymology*, 335, 319-321.

12. Domínguez, X. A. (1988). *Metodos de investigación Fitoquímica*. México: Limusa.
13. Ellis, B. E. (1983). Production of hydroxyphenylethanol glycosides in suspension cultures of *Syringa vulgaris*. *Phytochemistry*, 22, 1941-1943.
14. Evans, W. (2009). *Trease and Evans Pharmacognosy*. USA: Saunders.
15. Fernández, S., Wasowski, C., Paladini, A. C., & Marder, M. (2003). Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 77, 400-404.
16. G. Sarason, I. (1982). *Stress, Anxiety, and Cognitive Interference: Reactions to Tests*. Virginia: Organizational Effectiveness Research Program.
17. Giovannini, P., Reyes García, V., Waldstein, A., & Heinrich, M. (31 de Enero de 2011). Do pharmaceuticals displace local knowledge and use of medicinal plants? Estimates from a cross-sectional study in a rural indigenous community, Mexico. *Social Science & Medicine*, 72, 928-936.
18. Heinze Martin, G., & Camacho Segura, P. (2010). *Guía clínica para el manejo de la ansiedad*. México: Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.
19. Hernández Chávez, A. (2013). *Farmacología general: Una guía de estudio*. México: McGraw-Hill Interamericana.
20. Hongbin, Z., Yuzhi, W., Yuxuan, L., & Yalin, X. (2010). Analysis of Flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. *Food Anal. Methods*, 3, 90-94.
21. J. Vorvick, L. (11 de Noviembre de 2014). *National Institute of Health. Medline Plus*. Obtenido de Stress and your health: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003211.htm>
22. Jennifer T. Kubota, R. M. (2014). Stressing the person: Legal and everyday person attributions under stress. *Biological Psychology*, 103, 117-118.
23. Johnston, G., Hanrahan, J., Chebib, M., Duke, R., & Mewett, K. (2006). Modulation of Ionotropic GABA Receptors by Natural Products of Plant Origin. *Advances in Pharmacology*, 54, 307-309.
24. Keller B., R. (2009). *Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources*. Nueva York, EE.UU.: Nova Science Publishers.
25. Kohlheimer, M. (2003). Nutrient Metabolism. *Food Science and Technology*, 92-93.
26. Kuklinski, C. (2003). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. España: Omega.

27. Lapa, A. J., Soucar, C., Lima-Landam, M. T., & De Lima, T. (2002). *Métodos de Evaluación de la Actividad Farmacológica de Plantas Medicinales*. Sao Paulo: CYTED/CNPq.
28. Mandal, V., Mandal, S., & Kumar Das, A. (2015). *Essentials of Botanical Extraction*. Elsevier.
29. Marín, F., Frutos, M., Pérez-Alvarez, J., Martínez-Sánchez, F., & Del Río, J. (1 de Junio de 2002). Flavonoids as nutraceuticals: Structural related antioxidant properties and their role on ascorbic acid preservation. *Studies in Natural Products Chemistry*, 26, 741.
30. Merken, H. M., & Beecher, G. R. (Noviembre de 2000). Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *Journal of Chromatography A*, 897(1-2), 177-180.
31. Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. (Enero de 2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 101(1), 372-373.
32. Organización Mundial de la Salud. (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*. Hong Kong: Organización Mundial de la Salud.
33. Ou-yang, Z., Cao, X., Wei, Y., Zhang, W.-W.-Q., Zhao, M., & Duan, J.-a. (Septiembre-Octubre de 2013). Pharmacokinetic study of rutin and quercetin in rats after oral administration of total flavones of mulberry leaf extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(5), 776-782. Recuperado el 1 de Marzo de 2016, de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2013000500776](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2013000500776)
34. Pietta, P., & Mauri, P. (2001). Analysis of flavonoids in medicinal plants. *Methods in Enzymology*, 335, 26-29.
35. Randal D, M., Kendall, D., & Alexander, S. (2012). *Pharmacology*. Pharmaceutical Press.
36. Rose, J. E., & Behm, F. M. (1994). Inhalation of vapor from black pepper extract reduces smoking withdrawal symptoms. *Drug and Alcohol Dependence*, 34(3), 225-229.
37. Russo, E. B. (2011). Taming THC: Potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*, 163, 1347-1351.
38. Saimaru, H., & Orihara, Y. (2010). Biosynthesis of acteoside in cultured cells of *Olea europaea*. *Journal of Natural Medicine*, 64, 139-145.
39. Scrimshaw, M., & Cosminsky, S. (1980). Medical Pluralism on a Guatemalan Plantation. *Soc. Sci. & Med.*, 267-278.

- 
40. Seok-Joo, K., Honk-Ik, C., So-Jin, K., Jin-Hyun, P., Joon-Sung Kim, Young-Ho, K., . . . Sun-Mee, L. (Septiembre de 2014). Protective effect of linarin against d-galactosamine and lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure. *European Journal of Pharmacology*, 738, 66-67.
  41. Starcke, K., Polzer, C., Wolf T., O., & Brand, M. (2011). Does stress alter everyday moral decision making? *Psyneuroendocrinology*, 36, 210-212.
  42. Steru, L., Thierry, B., Chermat, R., Millet, B., Simon, P., & Porsolt, R. D. (1987). Comparing benzodiazepines using the staircase test in mice. *Psychopharmacology*, 92(1), 106-109.
  43. Universidad Nacional Autónoma de México. (2009). *Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana*. Obtenido de Salvia de bolita: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Salvia%20de%20bolita&id=7476>
  44. Valderrama, M. (2012). *El estrés, limitante del buen clima organizacional*. Obtenido de [http://ols.uas.mx/fen/gestione/Desp\\_Arts.asp?titulo=518](http://ols.uas.mx/fen/gestione/Desp_Arts.asp?titulo=518)
  45. Villar, A. (1999). *Farmacognosia General*. España: Síntesis.
  46. Vissiennon, C., Nieber, K., Kelber, O., & Butterweck, V. (2012 de 2012). Route of administration determines the anxiolytic activity of the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin - are they prodrugs? *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23, 733, 738.
  47. Vuorela, P. M., Oinonen, P. P., Jokela, J. K., & Hatakka, A. I. (Mayo de 2006). Linarin, a selective acetylcholinesterase inhibitor from *Mentha arvensis*. *Fitoterapia*, 77, 429-432.
  48. Zolla, C. (11 de Julio de 2012). Medicina Tradicional, Fundamental para la Salud del Mexicano. *Boletín de la Dirección General de Comunicación Social*. Obtenido de [http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2012\\_431.html](http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2012_431.html)



**UNAM**  
**CUAUTILÁN**

*“Por mi raza hablará el espíritu.”*