



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Actividad antiinflamatoria y perfil neurofarmacológico del  
"huitzquilitl" (*Cirsium ehrenbergii* Sch. Bip., Asteraceae), una  
planta del Códice De la Cruz-Badiano

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

LAURA RIGEL GONZALEZ DIEGO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. SILVIA LAURA GUZMAN GUTIERREZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx., 2019





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.

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

González  
Diego  
Laura Rigel  
55 1763 1294  
Universidad Nacional Autónoma de  
México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
31115466 9

### 2. Datos del tutor

Dra.  
Silvia Laura  
Guzmán  
Gutiérrez

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Ricardo  
Reyes  
Chilpa

### 4. Datos del sinodal 2

Dra.  
Helia Reyna  
Osuna  
Fernández

### 5. Datos del sinodal 3

Dr.  
José Guillermo  
Ávila  
Acevedo

### 6. Datos del sinodal 4

M. en C.  
Antonio  
Nieto  
Camacho

### 7. Datos del trabajo escrito.

Actividad antiinflamatoria y perfil neurofarmacológico del "huitzquilitl" (*Cirsium ehrenbergii* Sch.  
Bip., Asteraceae), una planta del Códice De la Cruz-Badiano  
69 pp.  
2019

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 2-4A del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química, UNAM, cuyo responsable es el Dr. Ricardo Reyes Chilpa.

## AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, DGAPA, UNAM), proyecto AG200418: “Química, Farmacología y Botánica de las Plantas del Códice De la cruz-Badiano de 1552” por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

Al programa “Nuevas Alternativas para el Tratamiento de Enfermedades Infecciosas” del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por el apoyo otorgado en la realización de este trabajo.

A la Dra. Mayra Silva Miranda, Investigadora Catedrática CONACyT-IIB, UNAM, por su apoyo en la realización de los experimentos con *Mycobacterium tuberculosis*.

Por su asistencia técnica en el Instituto de Química de la UNAM:

A A. Nieto y M. T. Ramírez del laboratorio de Pruebas Biológicas.

A L. Velasco, J.F. Pérez y M.C. García del laboratorio de Espectrometría de Masas.

A E. Huerta y H. Ríos del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear.

A M. León y E. Tapia del Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y la Conservación del Patrimonio Cultural, LANCIC-IQ-UNAM, el cual fue financiado por CONACyT (LN 232619, LN 260779, LN 279740, LN 293904, LN 271614 y LN 293904).

A B. Quiroz del Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear, LURMN-IQ-UNAM, el cual fue financiado por CONACyT (0224747) y la UNAM.

Al comité revisor de esta tesis:

Dr. Ricardo Reyes Chilpa.

Dra. Helia Reyna Osuna Fernández.

Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez.

Dr. José Guillermo Ávila Acevedo

M. en C. Antonio Nieto Camacho.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la UNAM, por todos los conocimientos y servicios brindados, y en especial a la Facultad de Ciencias por mi formación académica, pese a todo.

A la Dra. Laura Guzmán por aceptar dirigir esta tesis y guiarme en el proceso de todo el trabajo, por compartir conmigo sus conocimientos, por su paciencia y por su confianza durante todo este tiempo, muchas gracias.

Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa por recibirme en el taller y en su laboratorio, y por brindarme todo el apoyo necesario durante la realización del trabajo, muchas gracias.

A Toño de Pruebas Biológicas del IQ, por su apoyo en la realización de los experimentos de inflamación, por compartir su experiencia conmigo y por sus consejos, muchas gracias.

A todos los compañeros del laboratorio 2-4 del Instituto de Química, a Miriam, a Israel, a Mishel, a Karina, a Alma Soriano, a Paola 1 y 2, a Karlita, a Alfredo, a Rubén, a Félix, a Yoscelina, a Jorge, a Gris, a Heidi y a Dulce, por todo su apoyo desde que llegué al laboratorio, por compartir conmigo sus conocimientos y sus experiencias, por su ayuda, por su compañía, por su amistad, por su confianza y por hacer más divertido el trabajo en el lab, muchas gracias compañeros.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias: a Dafne, al “Sitio” entero, a mis amigos de Universum y a todos con quienes compartí buenas experiencias durante la carrera, por su amistad, por sus porras y por el apoyo emocional mutuo durante la realización de la tesis, los quiero mucho.

A todos mis amigos más cercanos, que siempre han estado conmigo apoyándome en todo y echándome porras para seguir alcanzando mis metas, ustedes saben quiénes son, los quiero muchísimo, muchas gracias.

Y finalmente, a todos quiénes de alguna manera colaboraron en la realización de esta tesis. Gracias.

*Dedicada a mi mamá, a mi papá y a mi hermano,  
por darme el apoyo incondicional, el amor, el cariño y todo  
el soporte necesario en los momentos más difíciles durante la  
carrera y durante la realización de esta tesis,  
a ustedes infinitas gracias de todo corazón,  
sin ustedes no hubiera podido lograrlo,  
los amo mucho.*

# ÍNDICE

Índice general .....	v
Índice de figuras.....	vii
Índice de cuadros.....	ix
Abreviaturas y símbolos.....	x
I. RESUMEN.....	- 1 -
II. INTRODUCCIÓN.....	- 2 -
III. ANTECEDENTES .....	- 4 -
3.1 Familia Asteraceae (Compositae).....	- 4 -
3.2 Género <i>Cirsium</i> Mill. ....	- 4 -
3.3 <i>Cirsium ehrenbergii</i> .....	- 5 -
3.4 Códice De la Cruz-Badiano .....	- 8 -
3.5 Uso medicinal actual de <i>Cirsium ehrenbergii</i> .....	- 10 -
3.6 Estudios farmacológicos previos con <i>Cirsium ehrenbergii</i> .....	- 10 -
3.7 Inflamación .....	- 11 -
3.8 Depresión y ansiedad .....	- 12 -
IV. JUSTIFICACIÓN .....	- 14 -
V. HIPÓTESIS.....	- 14 -
VI. OBJETIVOS .....	- 14 -
6.1 Objetivo general .....	- 14 -
6.2 Objetivos particulares .....	- 15 -
VII. MATERIAL Y MÉTODO .....	- 15 -
7.1 Colecta del material vegetal y ejemplar de herbario .....	- 15 -
7.2 Obtención de extractos orgánicos .....	- 16 -
7.3 Animales de experimentación.....	- 17 -
7.4 Modelo de inflamación inducida con TPA en oreja de ratón .....	- 17 -
7.5 Curva dosis-respuesta.....	- 19 -
7.6 Actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO).....	- 19 -
7.7 Tratamientos y administración para pruebas conductuales .....	- 20 -
7.8 Pruebas para determinar el perfil neurofarmacológico.....	- 20 -
7.9 Pruebas estadísticas .....	- 24 -

7.10 Cromatografía en Columna (CC) .....	- 24 -
7.11 Identificación de los compuestos aislados .....	- 25 -
7.12 Cernimiento de la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados .....	- 25 -
7.13 Evaluación de la actividad sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	- 25 -
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	- 26 -
8.1 Rendimiento de los extractos.....	- 26 -
8.2 Modelo de inflamación inducida con TPA .....	- 26 -
8.3 Curva Dosis-Respuesta.....	- 28 -
8.4 Actividad de la enzima MPO.....	- 30 -
8.5 Pruebas para determinar el perfil neurofarmacológico.....	- 31 -
8.6 Cromatografía en columna (CC) .....	- 37 -
8.7 Identificación de los compuestos aislados .....	- 40 -
8.8 Cernimiento de la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados .....	- 45 -
IX. CONCLUSIONES.....	- 46 -
X. REFERENCIAS .....	- 47 -

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Clasificación taxonómica y <i>Cirsium ehrenbergii</i> en campo.....	5
<b>Figura 2.</b> Mapa de distribución de <i>C. ehrenbergii</i> en México. Rojo: Ejemplares en museos, colectas y proyectos (SNIB) Verde: Observaciones de naturalista.com ciencia ciudadana. Obtenido de Enciclovida-CONABIO (2019).....	7
<b>Figura 3.</b> Lámina del folio 41r. del Códice, donde se describe el remedio para la “sangre negra” ( <i>Nigri remedium sanguinis</i> ) utilizando el “huitzquilitl” ( <i>Cirsium ehrenbergii</i> ) y el “tlatlanquaye” ( <i>Peperomia galioides</i> ). (De la Cruz, 1991).....	9
<b>Figura 4.</b> <i>Cirsium ehrenbergii</i> en campo y ejemplar de herbario depositado en FCME.....	15
<b>Figura 5.</b> Esquema para el grupo control del modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón ( <i>Mus musculus</i> cepa CD1).....	18
<b>Figura 6.</b> Esquema para los grupos tratados del modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón ( <i>Mus musculus</i> cepa CD1).....	18
<b>Figura 7.</b> Esquema de la metodología utilizada para probar la actividad antiinflamatoria de extractos de <i>C. ehrenbergii</i> en el modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón.....	19
<b>Figura 8.</b> Cilindro de exploración utilizado para probar la actividad sedante de extractos de <i>C. ehrenbergii</i> .....	21
<b>Figura 9.</b> Modelo conductual de campo abierto utilizado para evaluar la actividad motora espontánea al administrarlos extractos de <i>C. ehrenbergii</i> .....	22
<b>Figura 10.</b> Laberinto en cruz elevado para determinar la actividad ansiolítica de los extractos de <i>C. ehrenbergii</i> .....	23
<b>Figura 11.</b> Contenedor cilíndrico utilizado en el modelo de nado forzado para probar la actividad antidepresiva de los extractos de <i>C. ehrenbergii</i> .....	24
<b>Figura 12.</b> Efecto de los extractos de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , AcOEt y EtOH de <i>C. ehrenbergii</i> en el porcentaje de inhibición de la inflamación inducida por TPA, mostrando diferencias significativas* para CeDH (hojas) y CeDF (cabezuelas). Vehículo: cloroformo. Simbología: CeDH: extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> de hojas; CeDF: extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> de cabezuelas; CeDR: extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> de raíces; CeAH: extracto de AcOEt de hojas; CeAR: extracto de AcOEt de raíces; CeEH: extracto EtOH de hojas. Cada barra (n=3) representa $\bar{x} \pm$ EEM. ANOVA (p< 0.05), seguida de una prueba de Dunnett.....	27
<b>Figura 13.</b> Efecto de los extractos orgánicos de MeOH y EtOH de <i>C. ehrenbergii</i> en el porcentaje de inhibición de la inflamación inducida por TPA. Vehículo: agua-acetona 1:1. Simbología: CeMH: extracto MeOH de hojas, CeMF: extracto MeOH de cabezuelas; CeMR: extracto MeOH de raíces; CeER: extracto EtOH de raíces. Cada barra (n=3) representa $\bar{x} \pm$ EEM. ANOVA (p< 0.05). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.....	28

<b>Figura 14.</b> Curva dosis-respuesta del extracto de diclorometano de hojas de <i>C. ehrenbergii</i> (CEDH), comparada contra la curva dosis-respuesta de la Indometacina, fármaco control positivo.....	29
<b>Figura 15.</b> Actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) en muestras de oreja de ratón con inflamación inducida por TPA y tratadas con el extracto de diclorometano (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ) de <i>C. ehrenbergii</i> . Cada barra (n=4) representa $\bar{x} \pm$ EEM. ANOVA (p< 0.05).....	30
<b>Figura 16.</b> Efecto del extracto etanólico de <i>C. ehrenbergii</i> sobre el número de levantamientos que realiza el ratón en el modelo de cilindro de exploración. Cada barra (n=4) representa $\bar{x} \pm$ EEM. ANOVA (p< 0.05).....	32
<b>Figura 17.</b> Efecto del extracto etanólico de <i>C. ehrenbergii</i> sobre la actividad motora espontánea en ratones (modelo de campo abierto). Cada barra (n=5) representa $\bar{x} \pm$ EEM. ANOVA (p< 0.05).....	32
<b>Figura 18.</b> Efecto del extracto etanólico de <i>C. ehrenbergii</i> sobre el tiempo que el ratón pasa en los brazos abiertos del modelo de laberinto de cruz elevada. Cada barra (n=5) representa $\bar{x} \pm$ EEM. ANOVA (p< 0.05).....	33
<b>Figura 19.</b> Efecto del extracto etanólico de <i>C. ehrenbergii</i> sobre el número de cruces entre brazos del laberinto de cruz elevada. Cada barra (n=5) representa $\bar{x} \pm$ EEM. ANOVA (p< 0.05).....	34
<b>Figura 20.</b> Tiempo de inmovilidad de ratones después de la administración del extracto etanólico de <i>C. ehrenbergii</i> en la prueba de nado forzado. Cada barra (n=12) representa $\bar{x} \pm$ EEM. ANOVA (p< 0.05).....	36
<b>Figura 21.</b> Cromatoplaqueta de sílica gel del extracto de diclorometano:1: extracto de hojas, 2: extracto de cabezuelas, 3: extracto de raíces, mostrando compuestos similares para la muestra 1 y 2. Fase móvil: Hx-AcOEt 9:1.....	37
<b>Figura 22.</b> Representación de las diferentes polaridades de la fase móvil de la cromatografía en columna y los compuestos obtenidos.....	38
<b>Figura 23.</b> Columna cromatográfica al inicio y al final de la elusión con diferentes polaridades.....	40
<b>Figura 24.</b> Estructura química del pseudotaraxasterol.....	43
<b>Figura 25.</b> Estructura química del taraxasterol.....	44

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Metabolitos secundarios que contienen diversas especies del género <i>Cirsium</i> (Glasby, 1991; Ganzera <i>et al.</i> , 2005; Nazaruk y Gudej, 2003; Soon-Ho <i>et al.</i> , 2003; Lee <i>et al.</i> , 2002; Peng-Cheng <i>et al.</i> , 2019; Lai <i>et al.</i> , 2014 y Takaishi <i>et al.</i> , 1990) .....	6
<b>Cuadro 2.</b> Mediadores químicos de la respuesta inflamatoria aguda (León <i>et al.</i> , 2015).....	11
<b>Cuadro 3.</b> Rendimiento de los extractos orgánicos y acuoso, obtenidos a partir del material vegetal seco colectado.....	26
<b>Cuadro 4.</b> Peso de los sólidos de las fracciones aisladas en la columna cromatográfica.....	39
<b>Cuadro 5.</b> Composición química del sólido 12 identificada a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en el LANCIC-IQ, UNAM.....	41
<b>Cuadro 6.</b> Número de desplazamiento químico de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C de pseudotaraxasterol.....	43
<b>Cuadro 7.</b> Número de desplazamiento químico de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C de taraxasterol.....	44
<b>Cuadro 8.</b> Efecto inhibitorio del edema inducido con TPA en ratones de 4 sólidos aislados mediante CC del extracto de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> de <i>Cirsium ehrenbergii</i> . Cada muestra representa el promedio de tres repeticiones (n=3) ± EEM. ANOVA (p< 0.05* y p< 0.01**)......	45

## Abreviaturas y símbolos

<b>AcOEt</b>	Acetato de Etilo
<b>ANOVA</b>	Prueba estadística Análisis de Varianza
<b>CC</b>	Cromatografía en Columna
<b>CCF</b>	Cromatografía en Capa Fina
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Diclorometano
<b>cm</b>	centimetro
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>COX</b>	Cicloxigenasa
<b>CICUAL-IQ</b>	Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Química, UNAM
<b>DE<sub>50</sub></b>	Dosis efectiva 50
<b>DI<sub>50</sub></b>	Dosis inhibitoria 50
<b>EEM</b>	Error Estándar de la Media
<b>EtOH</b>	Etanol/etanólico
<b><i>et al.</i></b>	Del latín “y otros”
<b>Fig.</b>	figura
<b>g</b>	gramos
<b>h</b>	horas
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogeno
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>HTAB</b>	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
<b><i>in vivo</i></b>	Del latín “dentro del vivo”
<b>i.p.</b>	Vía de administración intraperitoneal
<b>LANCIC-IQ</b>	Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y la Conservación del Patrimonio Cultural del Instituto de Química, UNAM
<b>LOX</b>	Lipoxigenasa
<b>m</b>	metro
<b>M</b>	molar
<b>M. en C.</b>	Maestro en Ciencias
<b>m.s.n.m.</b>	metros sobre el nivel del mar
<b>MeOH</b>	Metanol

<b>mg/Kg</b>	miligramos por peso en kilogramos
<b>mg/mL</b>	miligramos por mililitro
<b>mg/oreja</b>	Miligramos por oreja
<b>mL</b>	mililitro
<b>mm</b>	milímetros
<b>mM</b>	milimolar
<b>MPO</b>	Enzima mieloperoxidasa
<b>n</b>	Número de muestra
<b>N</b>	Norte
<b>NIST</b>	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
<b>nm</b>	nanómetros
<b>NOM-062-ZOO-1999</b>	Norma Oficial Mexicana-062: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio
<b>O</b>	Oeste
<b>o.p.</b>	Vía de administración oral
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>REMA</b>	<i>Resazurin Microtitter Assay</i>
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
<b>TPA</b>	13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
<b>UNAM</b>	Universidad Nacional Autónoma de México
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>µg</b>	microgramos
<b>µL</b>	microlitros
<b><math>\bar{x}</math></b>	Media o promedio de la muestra
<b>°C</b>	grados centígrados
<b>°</b>	grados
<b>'</b>	minutos
<b>“</b>	segundos

## I. RESUMEN

México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en cuanto a mayor riqueza de plantas medicinales con alrededor de 4 mil especies registradas que equivalen al 15% de la flora total. Sin embargo, sólo el 5% de esta flora medicinal ha sido estudiada biológica, química y farmacológicamente. *Cirsium ehrenbergii* (Asteraceae), conocida como cardo santo o cardo rojo, es una especie reportada en el Códice De la Cruz-Badiano (1552), importante manuscrito histórico considerado el primer compendio de plantas medicinales en México escrito después de la conquista española. En este manuscrito *C. ehrenbergii* se reporta en un remedio contra la “sangre negra”, enfermedad interpretada como melancolía o depresión. Actualmente esta especie es utilizada en la medicina tradicional mexicana contra los nervios, desinflamación de heridas y padecimientos del sistema respiratorio. Existen pocos estudios realizados con esta especie, sin embargo, para *Cirsium japonicum* está reportado que posee actividad antidepresiva. Debido a lo anterior, en este trabajo se buscó probar la actividad de extractos orgánicos de *C. ehrenbergii* sobre el Sistema Nervioso Central (SNC), empleando pruebas neurofarmacológicas conductuales en ratones, que miden la actividad sedante, ansiolítica, antidepresiva y la actividad motora espontánea. Además, se evaluó la actividad antiinflamatoria de los extractos mediante el modelo de edema inducido con TPA en ratones, y la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) como marcador bioquímico de neutrófilos infiltrados. Los resultados obtenidos indican que el extracto de diclorometano posee actividad antiinflamatoria con un porcentaje de inhibición del edema de 54.62% y una IC<sub>50</sub> de 0.89 mg/oreja, lo cual se pudo corroborar al medir la actividad de la enzima MPO, donde se observó una disminución de su actividad. Por otra parte, el extracto etanólico de las hojas de *C. ehrenbergii* no posee actividad sobre el SNC tras administrarlo de forma aguda. Adicional a las pruebas biológicas, se realizó una cromatografía en columna (CC) para separar los compuestos del extracto de diclorometano que resultó activo en la actividad antiinflamatoria. De las fracciones obtenidas, se identificaron 5 sólidos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) o mediante Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H. Se identificó el pseudotaraxasterol, el taraxasterol, y una mezcla de β-sitosterol con estigmasterol. Algunos de estos compuestos ya se han reportado en otras especies de *Cirsium*. Con este estudio se contribuye al estudio químico y farmacológico de la especie, determinando los compuestos que justifican su uso medicinal.

## II. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, la humanidad ha recurrido a prácticas y remedios naturales, con el objetivo de buscar alivio a diversas enfermedades que el hombre ha padecido a lo largo del tiempo. Actualmente, el uso de algunas de estas prácticas es conocido como medicina tradicional, alternativa o complementaria. Uno de los elementos que conforman a la medicina tradicional son las plantas medicinales. Según estadísticas de la OMS, se estima que cerca del 80% de la población mundial ha recurrido a las plantas medicinales para satisfacer o complementar sus necesidades médicas (Ocegueda *et al.*, 2005).

En México, desde la época prehispánica se tiene registro del uso de plantas medicinales para el tratamiento de distintas enfermedades. Prueba de ello la podemos constatar en documentos históricos como el *Libellus de Medicinallibus Indorum Herbis*, conocido como el Códice De la Cruz-Badiano (1552), la Historia Natural de la Nueva España (1571-1577) y el Códice Florentino, también llamado Historia General de las Cosas de la Nueva España (1580), manuscritos donde se describen remedios y plantas utilizadas por los antiguos mesoamericanos desde antes de la conquista española.

Se conoce como herbolaria al conocimiento y prácticas terapéuticas adquiridas a lo largo del tiempo que utilizan plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades, y que en la actualidad continúan vigentes, sobre todo en sitios con bajos recursos o donde el sistema de salud no es eficiente para atender a toda la población (Ocegueda *et al.*, 2005).

Según la CONABIO, México es el segundo país a nivel mundial con mayor riqueza de plantas medicinales, con alrededor de 4 mil especies registradas, que equivalen al 15% de la flora total (Loa-Loza *et al.*, 1998). Esto tiene sentido debido a la gran riqueza florística que posee nuestro país con un gran número de biomas representados, producto de las condiciones fisiográficas, geológicas y climáticas presentes (Rzedowski, 1978).

La gran variedad de condiciones ambientales que existen en el territorio mexicano también da lugar a que las plantas biosinteticen una amplia variedad de sustancias químicas, que son los principios activos que las hace útiles para el manejo o tratamiento contra diversas enfermedades. Una sola planta medicinal puede contener uno o varios principios activos, lo que indica la complejidad y riqueza bioquímica que existe en la naturaleza. Sin embargo, en México sólo el 5% de la flora medicinal ha sido estudiada biológica, química y farmacológicamente (Ocegueda *et al.*, 2005). El estudio de estas especies vegetales y sus productos derivados, así como sus componentes activos y su actividad biológica, ha permitido el avance en el

conocimiento científico y el desarrollo de nuevos medicamentos que pueden servir como tratamientos terapéuticos para combatir distintas enfermedades (Rodríguez *et al.*, 2015).

El uso medicinal de *Cirsium ehrenbergii* fue reportado en la época colonial en el Códice De la Cruz-Badiano (1552), donde se nombra como “huitzquilitl”. Este códice recopila remedios tanto mexicas como europeos utilizados para tratar diferentes enfermedades. En este libro el “huitzquilitl” forma parte de tres remedios medicinales, uno de ellos para el tratamiento de la “sangre negra”. La “sangre negra” hace referencia a la melancolía, padecimiento descrito desde la época de Hipócrates (siglo IV a. C.) y que actualmente podemos relacionar con la depresión. En el manuscrito, el “huitzquilitl” también se encuentra presente en la descripción del remedio contra la “sarna” y contra la “frialdad del vientre”. En cuanto a su uso medicinal actual, esta especie se utiliza para la desinflamación de heridas, contra padecimientos respiratorios, irritación de ojos, reumas y para flujo y hemorragia vaginales (Pérez-Escandón *et al.*, 2003; Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

En este trabajo se realizó un estudio biodirigido de la especie vegetal *Cirsium ehrenbergii* Sch. Bip. (Asteraceae); por sus antecedentes históricos, y su uso medicinal actual, se evaluó la actividad antiinflamatoria de los extractos orgánicos, así como su actividad sobre el Sistema Nervioso Central. Además, se realizó el fraccionamiento del extracto que resultó más activo en las pruebas biológicas de inflamación, mediante cromatografía en columna (CC), de donde se aislaron algunos compuestos y se identificaron mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas y Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Además, se examinó también la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 Familia Asteraceae (Compositae)

Dentro de las angiospermas o plantas con flores, la familia de las compuestas (Asteraceae) es una de las más grandes, diversas y más ampliamente distribuidas en América. Alrededor del mundo se conocen aproximadamente de 950 a 1450 géneros y entre 20 000 y 30 000 especies. En México, existen alrededor de 373 géneros, de los cuales 3080 especies son nativas, además de 29 géneros introducidos. Frecuentemente se ven favorecidas por el efecto de la perturbación en las comunidades vegetales, por lo que es común encontrarlas creciendo de forma arvense, en forma de maleza compitiendo con los cultivos y jardines, o como ruderales en los caminos (Redonda-Martínez y Villaseñor-Ríos, 2011). Algunas de sus especies tienen uso ornamental, medicinal y alimenticio. Su uso medicinal ha llevado a la investigación de los metabolitos secundarios que producen las especies de esta familia y se han encontrado una gran variedad, como son: terpenos, alcaloides pirrolizidínicos, poliacetilenos, flavonoides, etc., los cuales son responsables de la actividad biológica de la familia en general (Heinrich *et al.*, 1998). A esta familia pertenece el árnica (*Heterotheca inuloides*), el cempasúchil (*Tagetes erecta*), la manzanilla (*Matricaria recutita*), los girasoles (*Helianthus annuus*) y los cardos, entre ellos el “cardo rojo” o “cardosanto” (*Cirsium ehrenbergii*), una especie cuyo uso ha sido reportado como tratamiento para diferentes padecimientos, desde la época prehispánica hasta la medicina tradicional mexicana más actual.

#### 3.2 Género *Cirsium* Mill.

El género *Cirsium* pertenece a la tribu Cardueae de las Asteráceas y comprende alrededor de 2050 taxones específicos e infraespecíficos descritos, aunque solo 481 son nombres aceptados (The Plant List, 2013). *Cirsium* es uno de los géneros más diversos y ampliamente distribuido de esta tribu. Sus especies se distribuyen desde el nivel del mar hasta las regiones alpinas y boreales de Canadá y los trópicos de América Central. Los miembros del género se encuentran en una gran variedad de hábitats, incluidos pantanos, bosques, praderas y desiertos (Keil, s.f.). Una gran diversidad de especies del género es utilizada en varias comunidades en el mundo y en México para tratar diferentes padecimientos de sus habitantes. Algunos ejemplos son: *C. anartiolepis*: para tratar el asma (Waizel y Waizel, 2009); *C. raphilepis*: para el dolor de riñón y bronquitis (Molina-Mendoza *et al.*, 2012) y *C. mexicanum* para tratar problemas relacionados con vías respiratorias y enfermedades como hipertensión y presión alta (Gheno-Heredia *et al.*, 2011).

En cuanto a la química, en diversas especies del género se ha reportado la presencia de flavonoides y derivados, además de otros compuestos como cumarinas, poliacetilenos, terpenos, esteroides y gliceroles en extractos de flores y partes aéreas de varias especies, de las cuales algunas también se ha probado su actividad biológica a través de diferentes ensayos (Ganzera *et al.*, 2005; Nazaruk y Gudej, 2003; Soon-Ho *et al.*, 2003 y Lee *et al.*, 2002) (Cuadro 1).

### 3.3 *Cirsium ehrenbergii*

La especie vegetal *Cirsium ehrenbergii*, con nombre en náhuatl “huitzquilitl” (cardo comestible) y de nombre común cardo santo o cardo rojo, es una planta herbácea perenne que llega a medir de 70 cm a 1.5 m de altura. Es de tallo erecto de color amarillento a rojizo, estriado con alto grado de pubescencia. Sus hojas son en general pecioladas, de 60 a 80 cm de largo, pinnatipartidas, con 5 a 10 segmentos triangulares a ovados y su margen es espinoso-dentado. Las cabezuelas son solitarias o agrupadas en los ápices de las ramas en inflorescencias hojosas. Su involucre contiene de 200 a 300 brácteas graduadas, las puntas son rosadas, el receptáculo puede ser plano o convexo y presenta de 100 a 250 flores con corolas también rosadas, así como las anteras y los estilos que son de color rojizo-rosado. Florece de agosto a mayo y en forma esporádica durante todo el año (Rzedowski y Calderón, 1995) (Figura 1).

---

#### *Cirsium ehrenbergii* Sch. Bip.

---

**Reino:** Plantae  
**División:** Magnoliophyta  
**Clase:** Equisetopsida  
**Subclase:** Magnoliidae  
**Superorden:** Asteranae  
**Orden:** Asterales  
**Familia:** Asteraceae  
**Tribu:** Cardueae  
**Género:** *Cirsium*  
**Especie:** *Cirsium ehrenbergii* Sch. Bip.



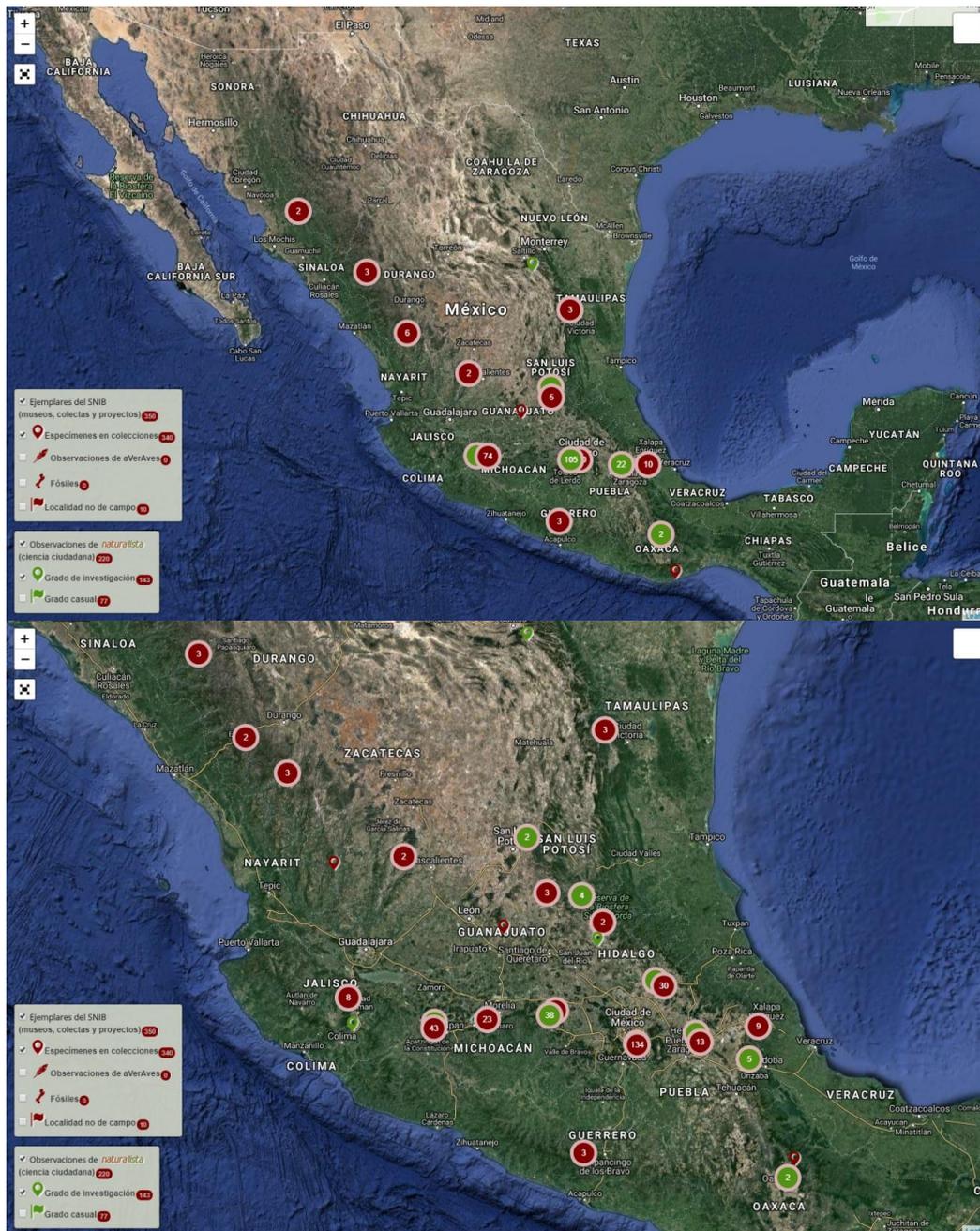
---

**Figura 1.** Clasificación taxonómica y *Cirsium ehrenbergii* en campo.

**Cuadro 1.** Metabolitos secundarios que contienen diversas especies del género *Cirsium* (Glasby, 1991; Ganzera *et al.*, 2005; Nazaruk y Gudej, 2003; Soon-Ho *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002; Peng-Cheng *et al.*, 2019; Lai *et al.*, 2014 y Takaishi *et al.*, 1990)

Especie	Flavonoides	Derivados de ácidos grasos	Terpenos	Esteroles
<i>C. arisanense</i> Kitam.	Linarina			
<i>C. arvense</i> (L.) Scop.	Linarina, acacetina, pectolinarigenina-7-O-β-glucopiranosido	Ciryneol C		
<i>C. ferum</i> Kitam.	Pectolinarina	Ácido fumárico		
<i>C. japonicum</i>	Pectolinarina, linarina, hispidulina-7-neohesperidosido, luteolina, silidianina	Ciryneol A, B, C, D, E, G, H, cirsiumina A, B, C, D, E, 9,10-Epoxy-16-heptadecene-4,6-diyne-8-ol 1-Heptadecene		
<i>C. kawakamii</i> Hayata	Luteolina 7-glicosido			
<i>C. rivulare</i> Jacq. All.	Tricina Apigenina Luteolina Hispidulina Linarina Apinenina 7-O-β-D-glucurónido Apinenina 7-O-β-D-glucósido			
<i>C. setidens</i> Nakai		Ácido α-linolénico Ácido linoleico Ácido palmítico	α-tocopherol, 25-hidroperoxicicloart-23-en-3β-ol, 24-hidroperoxicicloart-25-en-3β-ol, Mokkalactona, <i>Transfitol</i>	Acilglicosil β-sitosterol, (2R)-1,2-O-(9z, 12z, 15z-dioctadecatrienoil)-3-O-β-D-galactopiranosil glicerol, Glucósido β-sitosterol
<i>C. setosum</i> Willd	Linarina		22-oxo-20-taraxasten-3β, 30-diol 22α-hydroxy-20-taraxasten-30β, 30-triol, 20-taraxasten- 3β, 30-diol, 20-taraxasten-3β-ol	
<i>C. wallichii</i> DC.	--	Ácido fumárico		

*C. ehrenbergii* es una especie endémica de México, se distribuye principalmente en el área centro-sur del país, en la Ciudad de México y, según la literatura, en los estados de: México, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Morelos, Aguascalientes, Durango, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán de Ocampo, Oaxaca, Querétaro y Veracruz (Rzedowski y Calderón, 1995; Enciclovida-CONABIO, 2019) (Figura 2).



**Figura 2.** Mapa de distribución de *C. ehrenbergii* en México. Rojo: Ejemplares en museos, colectas y proyectos (SNIB) Verde: Observaciones de naturalista.com ciencia ciudadana. Obtenido de Enciclovida-CONABIO (2019).

### 3.4 Códice De la Cruz-Badiano

El primer documento sobre remedios medicinales redactado después de la Conquista, el *Libellus de medicinalibus indorum herbis* (Libro sobre las hierbas medicinales de los indígenas) es el antecedente etnobotánico más antiguo en América. Es un manuscrito de la época colonial del año 1552, dictado en náhuatl por el médico azteca Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano, un médico xochimilca. Fue elaborado en el Colegio de la Santa Cruz en Tlatelolco de la Ciudad de México. Este manuscrito contiene distintas descripciones de remedios medicinales de más de 150 plantas originarias de México empleadas en la medicina prehispánica (Ríos *et al.*, 2012). También es referido como el Códice De la Cruz-Badiano. El códice presenta ilustraciones coloridas y el nombre en náhuatl de algunas de las plantas utilizadas en los remedios medicinales descritos, por lo que gracias a ello la mayor parte de estas plantas se han podido interpretar botánicamente (Valdés *et al.*, 1992). Una de estas plantas es *Cirsium ehrenbergii* de nombre en náhuatl “huitzquilitl” o “cuauhtlahuitzquilitl” (cardo comestible o cardo comestible de las montañas) (Ortiz, 2017). En el códice la podemos encontrar en tres láminas (f. 8v., f. 32r. y f. 41r.), donde se describe su uso medicinal contra la “sarna” en combinación con otras dos plantas de nombre “tezonpahtli” y “tequammaytl”; y contra la “frialdad del vientre” en combinación con “copaliyacxiuhtontli”, “tlanextixiuhtontli” y “chichicxihuitl” (De la Cruz, 1991). Por último, el “huitzquilitl” es mencionado en el folio 41r. para elaborar un remedio contra la “sangre negra”, esto en combinación con otra planta llamada “tlatlanquaye”, la cual ha sido interpretada botánicamente como la especie *Peperomia galioides* (Piperaceae) (Valdés *et al.*, 1992). Este remedio para la “sangre negra” se describe de la siguiente manera (De la Cruz, 1991) (Fig. 3):

*“Se cuecen en agua las ramas y raíces molidas de las hierbas cuauhtlahuitzquilitl (huitzquilitl) y tlatlanquaye; se les agrega perla, hígado de lobo y pulque. Debe beber ese líquido así preparado.*

*Separadamente ha de beber antes de la comida el jugo exprimido de diversas flores que huelen bien. Ha de andar en lugar sombreado, y se ha de abstener de trato carnal. Beberá muy moderadamente el pulque y mejor no lo bebe, si no es como medicina. Dedíquese a cosas alegres, como es el canto, la música, el tocar los instrumentos con que acostumbramos acompañar nuestras danzas públicas”.*



**Figura 3.** Lámina del folio 41r. del Códice, donde se describe el remedio para la “sangre negra” (*Nigri remedium sanguinis*) utilizando el “huitzquilitl” (*Cirsium ehrenbergii*) y el “tlatlanquaye” (*Peperomia galioides*). (De la Cruz, 1991).

En Europa desde la época de los griegos hasta el siglo XIX se creía que la salud en el hombre era establecida por el equilibrio de los cuatro humores del cuerpo: la sangre, la flema, la bilis amarilla y la sangre negra (bilis negra). La melancolía era la sangre negra mezclada con hiel, debido a que en griego, al negro lo llaman melan (mélán), y a la hiel, colhn (jolén). En el siglo IV a. C., Hipócrates describió el cuadro patológico de la depresión con el nombre de melancolía, ya que, de acuerdo a su teoría, este padecimiento era originado por la sangre negra (Calderón y Colín, 2003).

Por lo tanto, el mal de la sangre negra, ya que se refiere a la melancolía, era el mal de la tristeza, y de acuerdo al Códice, uno de los remedios preparados con *C. ehrenbergii* era utilizado para animar a los enfermos de tristeza, es decir, enfermos cuyos síntomas están relacionados con lo que actualmente conocemos como depresión (*com. per.* Reyes-Chilpa, 2017). Con base en estas interpretaciones se propuso que *C. ehrenbergii* podría tener efecto antidepressivo o contra otros padecimientos relacionados con el sistema nervioso central como la ansiedad.

### **3.5 Uso medicinal actual de *Cirsium ehrenbergii***

Como ya se mencionó, varias especies del género *Cirsium* Mill. han sido utilizadas en épocas recientes dentro de la medicina tradicional mexicana para tratar diferentes padecimientos tanto en México, como alrededor del mundo. En el estado de Hidalgo, específicamente *Cirsium ehrenbergii*, se utiliza para tratar afecciones como flujo vaginal, tos, dolor de corazón y hemorragia vaginal. Se utilizan las hojas y las raíces, y se administra de forma oral en infusiones (Pérez-Escandón *et al.*, 2003). Además, en este mismo estado, en el municipio de Nicolás Flores utilizan las ramas de esta especie para tratar problemas como nervios e insomnio (Sánchez-González *et al.*, 2008).

En la Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana (2009) se reporta el uso medicinal de *C. ehrenbergii* para problemas respiratorios, por ejemplo para tos (mezclada con pitaya roja y canela) y pulmonía (mezclada con tabachin y flor de tila). También está reportada para la desinflamación de heridas, irritación de ojos, flujo vaginal y reumas.

### **3.6 Estudios farmacológicos previos con *Cirsium ehrenbergii***

Hay escasos estudios farmacológicos que justifiquen o corroboren la actividad medicinal de *Cirsium ehrenbergii*. Fernández-Martínez y colaboradores (2007) realizaron un estudio preliminar fitoquímico y biológico donde se encontró la presencia de alcaloides en extractos polares y no polares de esta especie. En este mismo estudio también se evaluó la toxicidad de los extractos en *Artemia salina*, la actividad antibacterial y el efecto relajante en músculo uterino de rata.

Fernández-Martínez y colaboradores (2018) realizaron un estudio donde probaron el efecto hepatoprotector del extracto hexánico de *Cirsium vulgare* y *Cirsium ehrenbergii*. En este estudio se encontró que ambos extractos poseen propiedades hepatoprotectoras ya que disminuyeron significativamente todos los indicadores de daño hepático.

Por otra parte, se ha encontrado que algunas especies del mismo género tienen actividad antiinflamatoria, por ejemplo *C. maackii* (Jung *et al.*, 2012), y particularmente en México se ha estudiado la actividad analgésica y antiinflamatoria de *C. subcoriaceum*, donde se encontró que el extracto acuoso de esta especie posee actividad antiinflamatoria dependiente de la dosis en una prueba de inducción de edema (Martínez-Vázquez *et al.*, 1998).

No se han llevado a cabo estudios que prueben la actividad sobre el Sistema Nervioso Central de *C. ehrenbergii*. Sin embargo, se ha probado la actividad pro-cognitiva y neuroprotectora en *C. rivulare* y *C. setidens* respectivamente (Walesiuk *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2016). Además, en un estudio realizado con la especie *C. japonicum* se determinó que posee actividad

antidepresiva de acuerdo a la prueba de nado forzado, donde observaron una disminución en el tiempo de inmovilidad de ratones a una dosis de 300 mg/Kg de extracto acuoso-metanólico al 80%, administrado por vía oral (Park *et al.*, 2006).

### 3.7 Inflamación

La inflamación es una respuesta del sistema inmunológico de un organismo ante un daño causado por agentes biológicos, químicos o físicos, sea un microorganismo infectante, una sustancia irritante o un golpe o traumatismo. El proceso inflamatorio es una cadena de eventos como respuesta reparadora que logra aislar la lesión, destruye el agente patógeno y repara el tejido con el fin de restaurar su funcionalidad junto con la del órgano afectado (Villalba, 2014). El proceso de inflamación consta de cambios vasculares y celulares mediados por factores químicos (mediadores de la inflamación) (Cuadro 2) que se manifiestan por los cuatro signos cardinales de la inflamación (dolor, calor, edema y rubor) descritos por Aulio Cornelio Celso, médico romano del siglo I a.C. El agente agresor, los mediadores de la inflamación y el aumento de la presión producida por la distensión los tejidos originan el dolor; el aumento del flujo sanguíneo en la zona afectada provoca el enrojecimiento de la zona (rubor); el aumento local de la temperatura después de la vasodilatación y el aumento del consumo local de oxígeno provoca calor, y por último, el aumento de la permeabilidad capilar junto con el hiperflujo de sangre provoca que se acumule agua en el intersticio que externamente se visualiza con un aumento del volumen que ocasiona el edema o tumor (García, 2008).

La inflamación puede presentarse de forma aguda como una reacción inmediata al agente agresor a través de la liberación de mediadores de defensa del organismo en el área de la lesión (Cuadro 2). También puede presentarse de manera crónica en un proceso prolongado en donde existe destrucción tisular, inflamación activa y el repetitivo intento de reparación (Villalba, 2014).

**Cuadro 2.** Mediadores químicos de la respuesta inflamatoria aguda (León *et al.*, 2015).

Mediador químico	Acción
Histamina y serotonina (aminas vasoactivas)	Incremento de la permeabilidad
Bradicinina	Incremento de la permeabilidad y dolor
C3a (producto del complemento, anafilotoxinas)	Incremento de la permeabilidad opsonina
C5a (producto del complemento, anafilotoxinas)	Incremento de la permeabilidad, quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria
Prostaglandinas (metabolitos del ácido araquidónico)	Vasodilatación, dolor, fiebre, activa a otros mediadores
Leucotrieno B <sub>4</sub> (metabolito del ácido araquidónico)	Quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria
Leucotrieno C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> , E <sub>4</sub> (metabolitos del ácido araquidónico)	Incremento de la permeabilidad, broncoconstricción, vasoconstricción
Metabolitos del oxígeno (radicales libres)	Incremento de la permeabilidad, lesión endotelial y tisular
Factor activador de plaquetas (PAF)	Incremento de la permeabilidad, broncoconstricción, cebado de leucocitos
Interleucina-1 (IL-1) y Factor de necrosis tumoral (TNF) (citocinas)	Reacciones de fase aguda, activación endotelial, quimiotaxis
Óxido nítrico	Incremento de la permeabilidad, vasodilatación, citotoxicidad

En la actualidad se cuenta con distintos tipos de tratamiento para contrarrestar los efectos de la inflamación, de manera que la lesión no deje secuelas en el tejido u órgano afectado. Uno de estos tratamientos es el farmacológico, sin embargo, debido a que los fármacos pueden tener diferentes mecanismos de acción dependiendo de su diana, se busca encontrar aquel que tenga la menor cantidad de efectos secundarios al administrarlo. En la búsqueda de nuevas sustancias químicas, por ejemplo las derivadas de plantas (productos naturales), se han desarrollado a la par diversos modelos biológicos en animales donde se pueda probar la actividad antiinflamatoria de extractos y compuestos de plantas. Uno de ellos es el modelo de edema inducido con 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA). Este modelo permite dilucidar la actividad antiinflamatoria utilizando ratones y aplicando de manera tópica el TPA, induciendo la inflamación, para posteriormente aplicar los tratamientos a evaluar (Young, 1983). El modelo tiene la ventaja de ser rápido y sencillo, utiliza poca cantidad de muestra, además de que la respuesta obtenida se debe a un efecto local del extracto evitando efectos de metabolismo y excreción de los componentes (Miño *et al.*, 2002). Además, este modelo tiene buena reproducibilidad de los resultados, y éstos se obtienen de manera rápida con poca probabilidad de error (Winyard y Willoughby, 2003).

### **3.8 Depresión y ansiedad**

La depresión es un trastorno mental del estado de ánimo caracterizado por la presencia de tristeza patológica y pérdida de interés general o placer por las cosas. Algunos de sus síntomas son sentimientos de culpa o falta de autoestima, trastornos del sueño o del apetito, sensación de cansancio y falta de concentración, además de otros síntomas físicos sin causas orgánicas aparentes (OMS, 2018). Diversos estudios indican que alrededor de la mitad de la población adulta con trastorno depresivo mayor presenta también uno o más trastornos de ansiedad (Berenzon *et al.*, 2013).

La ansiedad comprende diversos tipos de trastornos mentales que en general son caracterizados por la presencia de molestias relacionadas o similares al miedo como intranquilidad, desesperación, temor o preocupaciones excesivas. La ansiedad suele aparecer ante un evento estresante o una situación de peligro, se trata de una respuesta normal que manifiestan todas las personas, e incluso cierto grado de ansiedad es deseable para el manejo normal de las exigencias o demandas del medio ambiente. Cuando esta ansiedad sobrepasa cierto límite de intensidad o se supera la capacidad adaptativa entre el individuo y el medio ambiente, es cuando se convierte en un trastorno patológico provocando malestares

significativos a nivel físico, psicológico y conductual (Heinze y Camacho, 2011; Rodríguez, 2018).

Se calcula que más de 300 millones de personas padecen depresión a nivel mundial, en su mayoría mujeres, además de ser la principal causa de discapacidad en el mundo (OMS, 2018). Por otra parte, se calcula que más de 260 millones de personas tienen trastornos de ansiedad y que muchas personas padecen conjuntamente tanto depresión como ansiedad (OMS, 2017). Estos trastornos han estado en aumento en todo el mundo: entre 1990 y 2013 el número de personas con depresión o ansiedad ha aumentado de 416 millones a 615 millones y cerca de un 10% de la población mundial está afectado (OMS, 2016). Adicionalmente, en México, se ha encontrado que la depresión produce mayor discapacidad que otras condiciones crónicas como la diabetes, los trastornos respiratorios, las enfermedades cardíacas o la artritis (Berenzon *et al.*, 2013).

Debido a lo anterior, se han establecido una variedad de estudios que conlleven a encontrar alternativas de tratamiento, como la búsqueda de sustancias químicas derivadas de las plantas, a partir de las cuales se puedan desarrollar fármacos que atiendan a estos padecimientos. Para realizar estos estudios se han desarrollado diferentes modelos con el objetivo de conocer la actividad de extractos, fracciones y/o compuestos derivados de plantas que se utilizan en la medicina tradicional. Un ejemplo son los modelos conductuales desarrollados dentro de la neurofarmacología para conocer la actividad sobre el Sistema Nervioso Central del extracto o compuesto(s) en cuestión y, de esta manera, determinar su perfil neurofarmacológico (Kasper *et al.*, 2014; Rahmati *et al.*, 2017).

#### *Plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de la ansiedad y depresión*

Desde épocas antiguas hasta la actualidad se han utilizado una variedad de plantas medicinales para tratar la depresión y la ansiedad. Algunos ejemplos son la hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*), la valeriana (*Valeriana officinalis*), la pasiflora (*Passiflora incarnata*), el laurel (*Litsea glaucescens*), entre otras. Estas plantas contienen metabolitos secundarios como la hipericina, el ácido valerénico, diversos flavonoides y  $\beta$ -pineno y linalol respectivamente, los cuales han demostrado tener actividad antidepresiva o ansiolítica actuando sobre algunos mecanismos de acción enfocados a disminuir los síntomas de la depresión y bajar los niveles de ansiedad (García *et al.*, 2002; Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012).

## IV. JUSTIFICACIÓN

Las plantas poseen una variedad de compuestos químicos que les brindan diferentes propiedades y que las hacen útiles para tratar diversas enfermedades que aquejan a la población, sobre todo en áreas de bajos recursos donde la medicina tradicional se considera como la atención de salud primaria. De acuerdo a las estadísticas, en México sólo una pequeña parte de la flora potencialmente medicinal ha sido estudiada en aspectos como su biología, química y farmacología. Por ello, es importante llevar a cabo proyectos donde se estudie a estas especies vegetales y sus productos derivados, así como la actividad biológica que poseen y sus componentes activos. El objetivo es aportar un avance en el conocimiento científico y permitir el desarrollo de nuevos tratamientos para combatir las enfermedades.

La información etnobotánica reciente sobre el uso medicinal de *C. ehrenbergii* indica que se utiliza como desinflamante de heridas, además de que diversos estudios señalan que otras especies del género *Cirsium* poseen actividad antiinflamatoria, por lo que en este trabajo se evaluó dicha actividad con extractos de *C. ehrenbergii* en un modelo *in vivo*. Por otra parte, con base en lo descrito en el Códice de la Cruz-Badiano, se determinó si diferentes extractos de *C. ehrenbergii* tienen actividad antidepresiva, así como otros posibles efectos en el sistema nervioso central por medio de la evaluación de su perfil neurofarmacológico.

Adicionalmente, también se buscó encontrar los metabolitos secundarios que pudieran ser los responsables de la actividad biológica de la especie.

## V. HIPÓTESIS

Con base en los antecedentes etnomédicos de *Cirsium ehrenbergii*, se espera que esta especie presente actividad antiinflamatoria y/o sobre el sistema nervioso central.

## VI. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Determinar la actividad antiinflamatoria y sobre el sistema nervioso central de extractos orgánicos de *C. ehrenbergii*, e identificar del extracto más activo al menos uno de sus principios activos.

## 6.2 Objetivos particulares

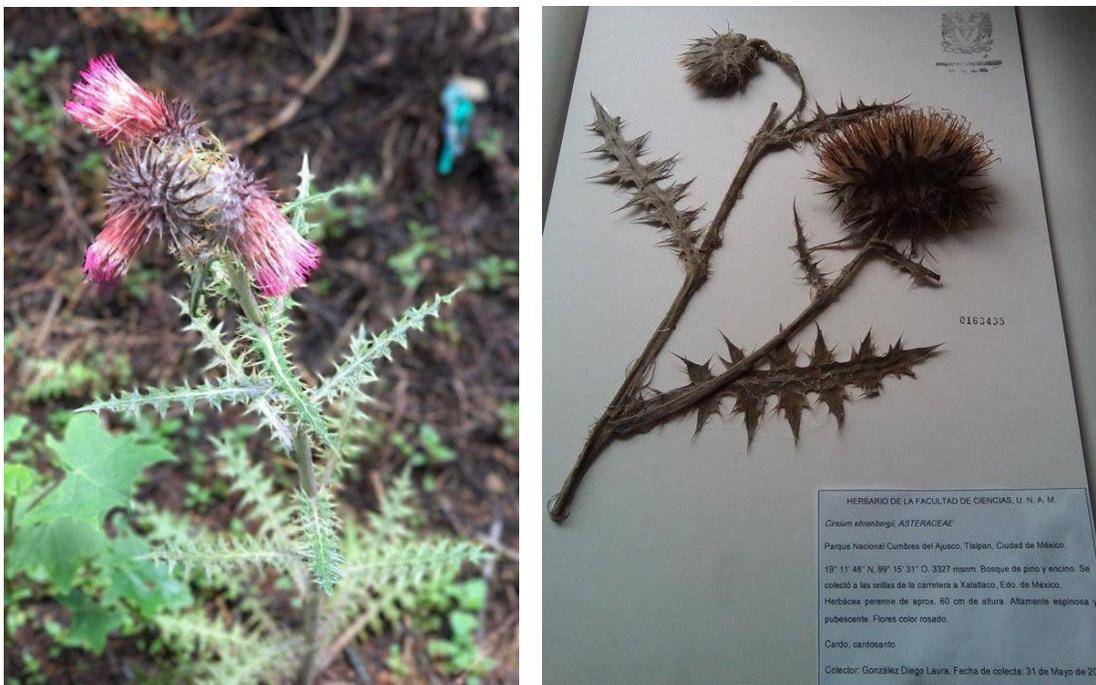
- Preparar extractos orgánicos de *C. ehrenbergii* con diferentes polaridades para su evaluación biológica.
- Determinar la actividad antiinflamatoria de *C. ehrenbergii in vivo* en ratones (*Mus musculus*) cepa CD1, macho.
- Determinar la actividad sobre el sistema nervioso central (SNC) de *C. ehrenbergii* mediante pruebas conductuales en ratones *in vivo*.
- Identificar al menos uno de los principios activos del extracto que resulte más activo en alguno de los modelos evaluados.

## VII. MATERIAL Y MÉTODO

### 7.1 Colecta del material vegetal y ejemplar de herbario

Se realizaron dos colectas del material vegetal en el Parque Nacional Cumbres del Ajusco, Ciudad de México, sobre la carretera Xalatlaco-El Ajusco. Lo anterior debido a que en el año 2010 el equipo de trabajo del laboratorio donde se realizó este trabajo (2-4 A del Instituto de Química de la UNAM), ya había encontrado, colectado e identificado a *Cirsium ehrenbergii* en este mismo sitio.

La primera colecta se realizó el 31 de mayo de 2017, en las coordenadas: 19° 11' 48" N, 99° 51' 31" O a 3327 m.s.n.m. y en un segundo sitio con las coordenadas 19° 11' 49 " N, 99° 99° 15' 29" O a 3420 m.s.n.m. El ejemplar se depositó en el herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM (FCME) con número de registro 0163435. Una segunda colecta se realizó el día 11 de octubre de 2017 en las mismas coordenadas ya mencionadas (Fig. 4).



**Figura 4.** *Cirsium ehrenbergii* en campo y ejemplar de herbario depositado en el herbario FCME.

## 7.2 Obtención de extractos orgánicos

El material vegetal de la primera colecta (mayo de 2017) se dividió en raíces, hojas y cabezuelas y se dejó secar a temperatura ambiente por dos semanas. Después, el material vegetal seco se trituró, se pesó y se maceró con el primer disolvente a utilizar: diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) por 3 días. Posteriormente el extracto se filtró y se concentró en un rotavapor BÜCHI R-II a presión reducida y se dejó secar en una campana de extracción para que el disolvente se terminara de evaporar. Esto se repitió 3 veces, además de diclorometano, con acetato de etilo ( $\text{AcOEt}$ ) y metanol ( $\text{MeOH}$ ) de manera consecutiva.

Con el material vegetal de la segunda colecta (octubre 2017) se preparó el extracto etanólico de *C. ehrenbergii*. De igual manera, se dividió en raíces, hojas y cabezuelas y se dejó secar a temperatura ambiente por dos semanas. Posteriormente, el material vegetal se trituró, se pesó y se le agregó etanol ( $\text{EtOH}$ ), dejándolo macerar por 3 días. Este procedimiento también se repitió 3 veces. Los extractos se filtraron, se concentraron en el rotavapor y se terminó de eliminar el disolvente en la campana de extracción.

El material vegetal de la segunda colecta también se utilizó para la elaboración del extracto acuoso de partes aéreas de *C. ehrenbergii*. Sin embargo, este extracto no se utilizó para el análisis y los experimentos, ya que mostró un cambio de coloración durante el proceso de liofilización, por lo que es posible que los metabolitos secundarios se hubieran degradado.

Todos los extractos se almacenaron en un frasco de vidrio bien tapado y sellado con plástico Parafilm M., y en refrigeración hasta el momento de su utilización. Para obtener los rendimientos de los extractos de *C. ehrenbergii* se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{100 \times \text{Peso del extracto (g)}}{\text{Peso del material vegetal seco utilizado (g)}} = \% \text{ de rendimiento del extracto}$$

### 7.3 Animales de experimentación

La evaluación de la actividad en el sistema nervioso central y antiinflamatoria se realizó con ratones (*Mus musculus*) de la cepa CD1 machos (25 a 30 g) de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana Campus Xochimilco. Los experimentos realizados siguen los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), que está en armonía con las reglas internacionales sobre el uso de animales de experimentación. Además, los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de ética del Instituto de Química, CICUAL-IQ-002-17 y CICUAL-IQ-004-17. Los animales se mantuvieron en jaulas en grupos de 10, con acceso libre a agua y alimento, en un cuarto de alojamiento del Instituto de Química a temperatura controlada (20-26°C) y un ciclo luz/obscuridad de 12/12 h. En este sitio también se llevaron a cabo los ensayos para determinar la actividad antiinflamatoria de los extractos de *C. ehrenbergii*, así como también las pruebas conductuales para determinar el perfil neurofarmacológico de *C. ehrenbergii*.

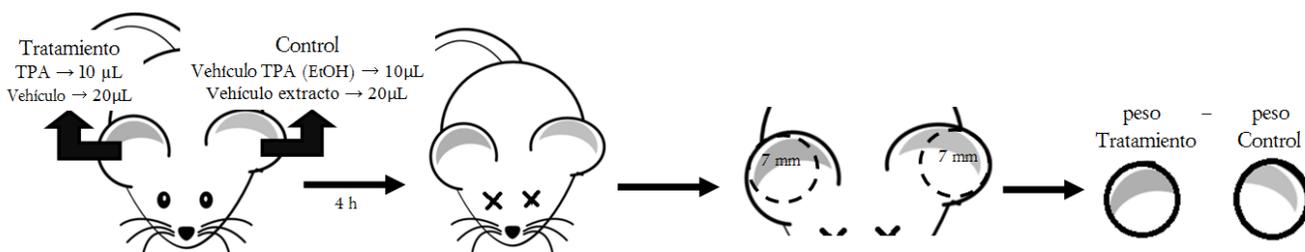
### 7.4 Modelo de inflamación inducida con TPA en oreja de ratón

El ensayo de edema inducido con 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) se realizó siguiendo la metodología ya descrita anteriormente (Oviedo-Chávez, 2007). Se emplearon ratones macho de la cepa CD1 (25-30 g). Se realizó el cernimiento de la actividad antiinflamatoria (n=3) de los siguientes extractos orgánicos de *C. ehrenbergii*: diclorometano (hojas, cabezuelas y raíces), acetato de etilo (hojas y raíces), metanol (hojas, cabezuelas y raíces) y etanol (hojas y raíces), más un grupo control positivo al que sólo se le administró TPA. Para llevar a cabo el modelo, bajo anestesia general con pentobarbital sódico (63 mg/Kg, i.p.), en la oreja derecha (tratamiento) se aplicaron 10 µL de una solución etanólica de TPA (0.25 mg/mL). Diez minutos después, en la misma oreja se aplicaron los extractos ya mencionados a

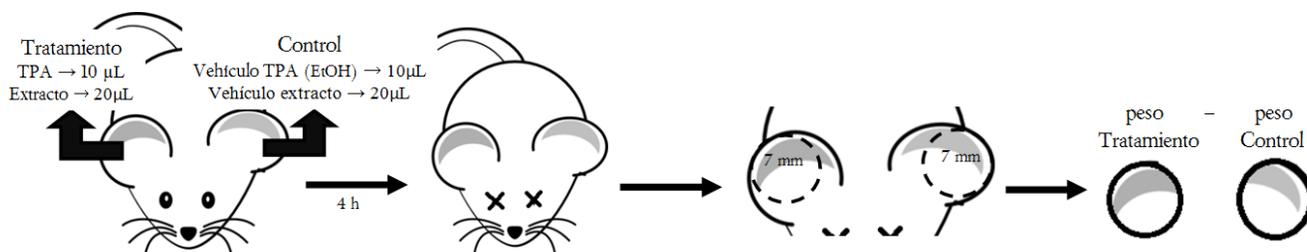
una dosis de 1 mg/oreja, previamente disueltos en 20  $\mu\text{L}$  del vehículo (en este caso se utilizó cloroformo y mezcla de agua-acetona 1:1). La oreja izquierda (control) recibió solamente 10  $\mu\text{L}$  de etanol y 20  $\mu\text{L}$  del vehículo del compuesto. Cuatro horas después a la aplicación del TPA, los animales se sacrificaron con  $\text{CO}_2$  para tomar una biopsia de 7 mm de diámetro de ambas orejas. El incremento del peso de la muestra derecha con respecto a la izquierda representa el edema. (Fig. 5 y 6). El porcentaje de la inhibición del edema se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición del edema (\%)} = \frac{C-E}{C} \times 100$$

Donde C = edema inducido en el grupo control positivo (sólo aplicación TPA) y E = edema inducido por TPA en los grupos experimentales tratados con los diferentes extractos orgánicos (TPA más el extracto).



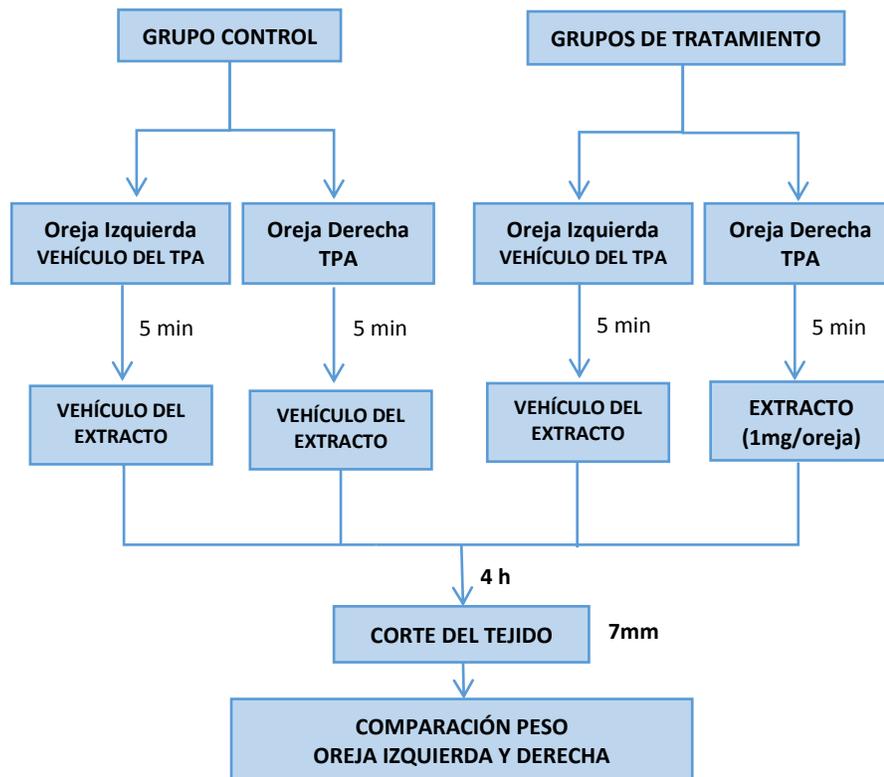
**Figura 5.** Esquema para el grupo control del modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón (*Mus musculus* cepa CD1).



**Figura 6.** Esquema para los grupos tratados del modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón (*Mus musculus* cepa CD1).

## 7.5 Curva dosis-respuesta

Posteriormente, con el extracto que presentó mayor actividad en el cernimiento de la actividad antiinflamatoria (extracto de diclorometano) se construyó una curva dosis-respuesta, utilizando como variables “x” y “y” que corresponden a los valores de la dosis y los porcentajes de inhibición del edema, respectivamente. Se administraron 3 dosis diferentes: 0.32, 0.56 y 1.78 mg/oreja. Con estos datos se obtuvo la dosis inhibitoria 50 (DI<sub>50</sub>), mediante un análisis de regresión lineal de la curva dosis-respuesta. La DI<sub>50</sub> se define como la dosis a la que se produce el 50% de inhibición de la inflamación respecto a la inflamación máxima (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema de la metodología utilizada para probar la actividad antiinflamatoria de extractos de *C. ehrenbergii* en el modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón.

## 7.6 Actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO)

Después de realizar la curva dosis-respuesta del extracto de diclorometano de hojas, se utilizaron las biopsias de oreja de los ratones para determinar la inhibición de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO), con el fin de observar de manera indirecta la disminución en la migración de neutrófilos en las biopsias inflamadas.

Para observar la actividad de la MPO, se utilizó una prueba colorimétrica según el método de Bradley y colaboradores (1982a) y de Suzuki y colaboradores (1983). De acuerdo a este método, cada tejido (oreja) se homogenizó por 30 segundos a 4°C con 1 mL de HTAB al 0.5%M en PBS 80 mM y pH 5.4. El homogenizado obtenido se congeló y descongeló 3 veces y por último se colocó en un baño ultrasónico por 20 segundos y se centrifugó de 5 a 10 minutos a 12,000 rpm a 4°C. Después, se colocaron 10 µL del sobrenadante en una placa de 96 pozos por cuadruplicado, se mezclaron con 180 µL de PBS al 80 mM sin HTAB y se calentó a 37° C. Una vez que se mantuvo a esta temperatura, se agregaron 20 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.017% y para iniciar la reacción se agregaron 20 µL de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) al 18.4 mM. La placa se incubó a 37°C por 5 minutos con agitación. Para detener la reacción se agregaron 20 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2 M. Al terminar se midió la absorbancia a 450 nm. La actividad de la MPO fue expresada como densidad óptica/biopsia.

### **7.7 Tratamientos y administración para pruebas conductuales**

En una primera parte se realizaron las siguientes pruebas conductuales consecutivamente: cilindro de exploración, campo abierto y laberinto en cruz elevada. Se evaluó el extracto etanólico de las hojas de *C. ehrenbergii*. El extracto se suspendió en Tween 80 y en solución salina al 0.9%. Se administraron 3 dosis diferentes (tratamientos): 30, 100 y 300 mg/Kg, además de un grupo control negativo al que sólo se le administró el vehículo. Los tratamientos se administraron por vía oral (p.o.), 30 minutos antes de realizar las pruebas conductuales. Cada grupo experimental incluyó 4-5 ratones.

En la segunda parte se realizó la prueba de nado forzado. Se evaluó el extracto etanólico de hojas de *C. ehrenbergii* suspendido en solución salina al 0.9% con Tween 80. Se administró una dosis de 300 mg/Kg, el cual se comparó con un grupo control negativo al que sólo se administró solución salina (9.0%) y un control positivo Imipramina (22.6 mg/Kg), el cual es un fármaco antidepresivo. Los tratamientos fueron administrados por vía oral, 24, 18 y 1 hora antes de realizar los experimentos conductuales. Cada grupo experimental fue integrado por 12 ratones.

Para ambas partes de esta metodología se realizó según Guzmán-Gutiérrez y colaboradores (2012).

### **7.8 Pruebas para determinar el perfil neurofarmacológico**

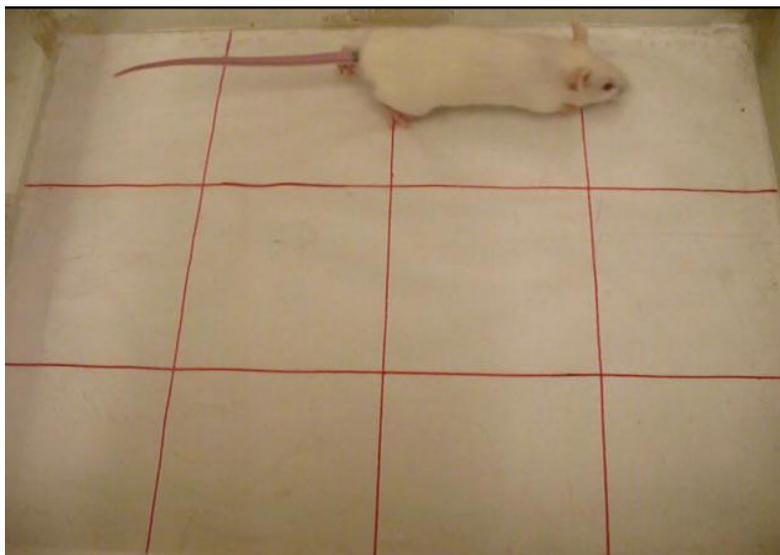
*Cilindro de exploración.* Para determinar la actividad sedante del extracto se utilizó el modelo de cilindro de exploración. Para realizar la prueba se utilizó un cilindro de vidrio transparente de

aproximadamente 30 cm de altura y 11 cm de diámetro. El ratón se colocó en el centro del cilindro sobre un papel blanco y se contabilizó el número de levantamientos que realizó el ratón sobre sus extremidades posteriores durante un periodo de 5 minutos (Fig. 8). Entre cada ratón, el interior del cilindro se limpió con solución etanólica (30%) y se cambió el papel blanco del centro. Una exploración reducida (poco número de levantamientos) en un ambiente no familiar para el ratón, comparada con el grupo control, se interpretó como un efecto sedante (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012).



**Figura 8.** Cilindro de exploración utilizado para probar la actividad sedante de extractos de *C. ehrenbergii*.

*Campo abierto.* Para evaluar la actividad motora al administrar el extracto de *C. ehrenbergii* se utilizó el modelo de campo abierto. Este modelo se realizó en una caja de acrílico de 21 x 28 cm dividida en 12 cuadrados de áreas iguales. Cada animal se colocó en el centro del aparato, siempre en la misma dirección, y se contabilizó el número de cuadrados recorridos con las cuatro extremidades del ratón durante un periodo de 2 minutos (Fig. 9). Se grabó cada individuo con una cámara de video para analizar la grabación después del experimento. Si el número de cuadrantes recorridos de los grupos de prueba fue significativamente diferente al del grupo control, se interpretó que el extracto evaluado produce un cambio en la actividad motora espontánea (Archer, 1973, Herrera-Ruiz *et al.*, 2006).



**Figura 9.** Modelo conductual de campo abierto utilizado para evaluar la actividad motora espontánea al administrar los extractos de *C. ehrenbergii*.

*Laberinto en cruz elevado.* Este modelo se utilizó para determinar la actividad ansiolítica del extracto evaluado de *C. ehrenbergii*. El laberinto en cruz elevado consiste en un laberinto elevado 50 cm sobre el suelo y se compone de dos brazos abiertos (30 cm x 5 cm de ancho) y dos brazos cerrados de las mismas dimensiones con una plataforma central de 5 x 5 cm (Fig. 10). Cada animal se colocó en el centro del laberinto siempre hacia una misma dirección (hacia uno de los brazos abiertos). Durante 5 minutos se midió el tiempo que el ratón pasaba en los brazos abiertos y el número de entradas totales hacia cada brazo, considerando que las cuatro extremidades del ratón entraran al brazo. Cada individuo fue grabado con una cámara de vídeo y analizado después del experimento. Una mayor cantidad de tiempo que el ratón estuviera en los brazos abiertos, comparada con el grupo control, se interpretó como un efecto ansiolítico del extracto (Pellow y File, 1986, Lister, 1987, Rejón-Orantes *et al.*, 2011).



**Figura 10.** Laberinto en cruz elevado utilizado para determinar la actividad ansiolítica de los extractos de *C. ehrenbergii*.

*Nado forzado.* El modelo de nado forzado se utiliza para determinar la actividad antidepresiva de compuestos y/o posibles fármacos. Consta de un recipiente cilíndrico de 27 cm de altura x 10 cm de diámetro, al cual se le agrega agua a 25°C hasta una altura de 15 cm (Fig. 11). Para evaluar la actividad antidepresiva de extractos de *C. ehrenbergii*, una hora después de la administración de la tercera dosis de la muestra, se colocaron a los ratones en el agua por 6 minutos. Entre cada individuo se va colocando agua limpia nuevamente. Todos los individuos fueron grabados con una cámara de video y analizados después del experimento. Se registró el tiempo total (segundos) que el ratón permanecía inmóvil después de dos minutos de haber sido ingresado al agua. Se consideró que el animal permanecía inmóvil cuando no hacía ningún intento de escapar del lugar, a excepción de los movimientos necesarios para mantenerse flotando. En esta prueba conductual, una disminución del tiempo de inmovilidad en el grupo al que se le administró el tratamiento comparado con el grupo control, indica un efecto antidepresivo del extracto (Porsolt *et al.*, 1977).



**Figura 11.** Contenedor cilíndrico utilizado en el modelo de nado forzado para probar la actividad antidepresiva de los extractos de *C. ehrenbergii*.

### 7.9 Pruebas estadísticas

Se verificó la distribución normal y homogeneidad de varianza de los datos para aplicar ANOVA. Todos los datos se analizaron con una prueba de ANOVA (1 vía) a una  $p < 0.05$  seguidas de una prueba de Dunnett, con el programa Graph Pad Prism 7.02.

### 7.10 Cromatografía en Columna (CC)

Se preparó una cromatografía en columna (CC) para realizar el fraccionamiento y posterior aislamiento de los compuestos del extracto de hojas de diclorometano de *C. ehrenbergii*, ya que fue el que resultó más activo en la evaluación de la actividad antiinflamatoria. Para ello, se pesaron 3 g del extracto y se disolvieron en diclorometano, se mezcló con celita y finalmente se colocó en la campana de extracción para evaporar por completo el disolvente. La mezcla obtenida se agregó a una columna cromatográfica de vidrio previamente empaquetada con sílica gel y hexano, después se comenzó a eluir utilizando como fase móvil este mismo disolvente. A la fase móvil se le fue incrementando la polaridad progresivamente mezclando el hexano con acetato de etilo hasta llegar a una fase móvil de 100% acetato de etilo.

Las fracciones obtenidas se concentraron en un rotavapor BÜCHI R-II y se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF) en fase normal. Para ello se observaron en luz UV de onda

corta (254 nm) y de onda larga (366 nm) y se revelaron con sulfato cérico. Se reunieron las fracciones que mostraban una composición similar en el análisis de CCF.

Para la limpieza y purificación de los compuestos se utilizó un disolvente de polaridad contraria en el que se obtuvo el compuesto, y se filtró a vacío para obtener la muestra sólida limpia, la cual se almacenó en un vial para su posterior análisis (elucidación estructural). En algunos casos fue necesaria su purificación por cromatografía en placa preparativa.

### **7.11 Identificación de los compuestos aislados**

Para identificar los compuestos obtenidos en la columna cromatográfica se realizaron análisis de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas en el Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y la Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC) en el Instituto de Química de la UNAM. También, algunas fracciones fueron enviadas a Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . La identificación de los compuestos se realizó mediante la comparación de los resultados obtenidos en dichos análisis y lo reportado en la literatura.

### **7.12 Cernimiento de la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados**

Se realizó el cernimiento de la actividad antiinflamatoria de cuatro sólidos obtenidos en la cromatografía en columna, utilizando el modelo de edema inducido con TPA. La metodología utilizada fue la misma ya descrita para el cernimiento de la actividad antiinflamatoria que se realizó con todos los extractos orgánicos obtenidos de *C. ehrenbergii*.

### **7.13 Evaluación de la actividad sobre *Mycobacterium tuberculosis***

Según los reportes más recientes del uso medicinal actual de *C. ehrenbergii*, se utiliza mezclada con otras plantas para el tratamiento de enfermedades respiratorias (Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana), por lo que se decidió evaluar la actividad de algunos extractos de *C. ehrenbergii* sobre la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.

La actividad anti-micobacteriana se realizó mediante el ensayo de REMA (Resazurin Microtiter Assay), con el apoyo de la Dra. Mayra Silva Miranda en el laboratorio de Bioseguridad BSL-3, utilizando un inóculo de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC27294. Sin embargo ninguno de los extractos evaluados presentó actividad significativa.

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Rendimiento de los extractos

El peso del material vegetal seco utilizado fue de 78 g de raíces, 300 g de hojas y 222 g de cabezuelas para realizar la extracción continua con diclorometano, acetato de etilo y metanol. Para la elaboración del extracto etanólico se utilizaron 58.77 g de raíces, 50 g hojas y 60 g de cabezuelas.

El mayor rendimiento fue del extracto metanólico en cabezuelas, raíces y hojas con un 7.30%, 10.42% y 6.42% (peso seco del material vegetal), respectivamente, seguido por el extracto de diclorometano en cabezuelas con un 4.09% y el extracto etanólico en raíces y hojas con 1.12% y 2.44% respectivamente, esto a pesar de que se utilizó una menor cantidad de material vegetal seco para la elaboración del extracto etanólico (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Rendimiento de los extractos orgánicos y acuoso, obtenidos a partir del material vegetal seco colectado.

Extracto	Peso de cada extracto (g)			Rendimiento (%)		
	Cabezuelas	Raíz	Hoja	Cabezuelas	Raíz	Hoja
Diclorometano	9.09	0.16	5.61	<b>4.09</b>	0.21	1.87
Acetato de Etilo	1.5	0.21	1.93	0.68	0.27	0.64
<b>Metanol</b>	16.21	8.13	19.26	<b>7.30</b>	<b>10.42</b>	<b>6.42</b>
Etanol	0.18	0.66	1.22	0.3	<b>1.12</b>	<b>2.44</b>
Acuoso (partes aéreas)		6.57			21.12	

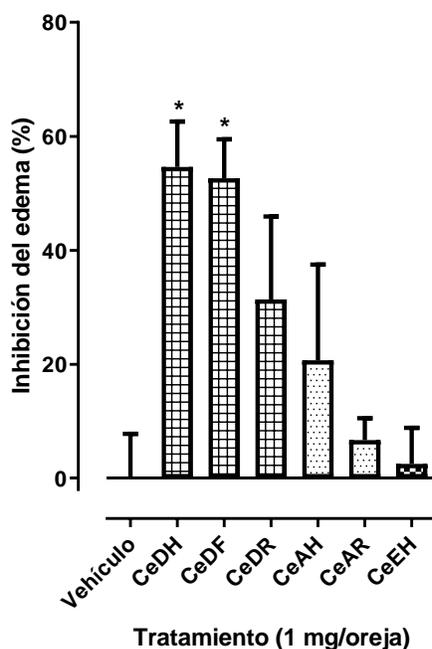
### 8.2 Modelo de inflamación inducida con TPA

El modelo de edema inducido por TPA en oreja de ratón es muy utilizado para evaluar sustancias con posible efecto antiinflamatorio. El proceso inflamatorio que se desencadena por la aplicación tópica del TPA se debe a la activación de la proteína cinasa C (PKC) dérmica y fosfolipasa A2, así como también a la producción de prostaglandinas y leucotrienos (Matulevich *et al.*, 2016). Los agentes antiinflamatorios que suelen mostrar actividad en este modelo son los que se encargan principalmente de inhibir las enzimas cicloxigenasa (COX) y lipoxigenasa

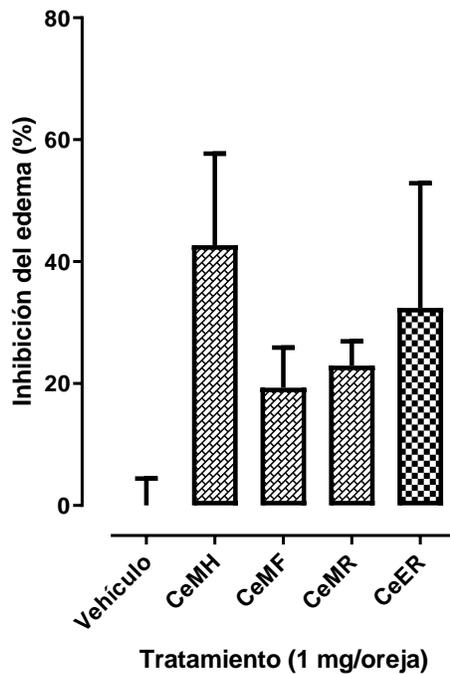
(LOX), y los inhibidores de la COX parecen ser más efectivos que los inhibidores de la LOX para reducir la respuesta edematosa (Matulevich *et al.*, 2016).

El cernimiento de la actividad antiinflamatoria se realizó con los extractos orgánicos de *C. ehrenbergii*, administrados por vía tópica a una concentración de 1 mg/oreja. Los resultados arrojaron que los extractos de diclorometano de hojas y cabezuelas son los que poseen actividad antiinflamatoria, con un porcentaje de inhibición del edema de 54.62% y 52.66% respectivamente, por lo que mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo control al que sólo se administró TPA. Como ya se mencionó en la metodología, los extractos se disolvieron de acuerdo a su solubilidad en cloroformo y en una mezcla de agua-acetona 1:1, por lo que se compararon respecto al control tomando en cuenta su disolvente utilizado (Figuras 12 y 13).

Si tomamos en cuenta estos resultados, se podría inferir que los metabolitos secundarios contenidos en los extractos activos podrían tener la capacidad de inhibir a la COX y/o LOX, esto sólo en caso de que su mecanismo de acción actúe como generalmente se ha observado en diversos estudios donde se ha utilizado el modelo de inflamación inducida con TPA (Matulevich *et al.*, 2016).



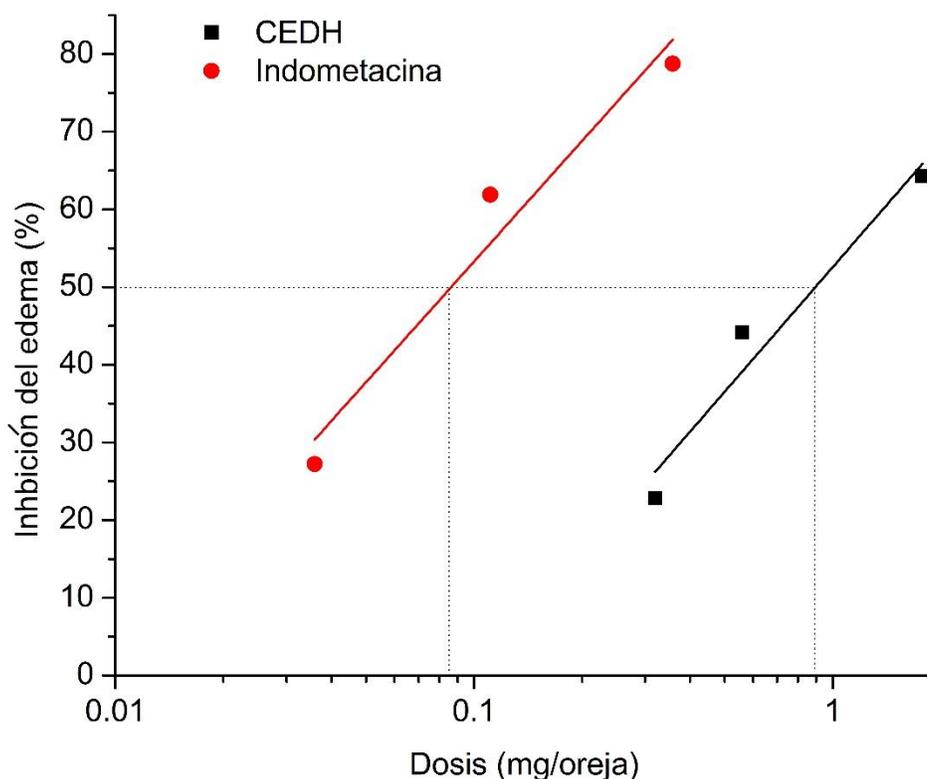
**Figura 12.** Efecto de los extractos de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt y EtOH de *C. ehrenbergii* en el porcentaje de inhibición de la inflamación inducida por TPA, mostrando diferencias significativas (\*) para CeDH (hojas) y CeDF (cabezuelas). Vehículo: cloroformo. Simbología: CeDH: extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de hojas; CeDF: extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de cabezuelas; CeDR: extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de raíces; CeAH: extracto de AcOEt de hojas; CeAR: extracto de AcOEt de raíces; CeEH: extracto EtOH de hojas. Cada barra (n=3) representa  $\bar{x} \pm$  EEM. ANOVA ( $p < 0.05$ ), seguida de una prueba de Dunnett.



**Figura 13.** Efecto de los extractos orgánicos de MeOH y EtOH de *C. ehrenbergii* en el porcentaje de inhibición de la inflamación inducida por TPA. Vehículo: agua-acetona 1:1. Simbología: CeMH: extracto MeOH de hojas, CeMF: extracto MeOH de cabezuelas; CeMR: extracto MeOH de raíces; CeER: extracto EtOH de raíces. Cada barra (n=3) representa  $\bar{x} \pm EEM$ . ANOVA ( $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

### 8.3 Curva Dosis-Respuesta

Se observó un efecto dosis-dependiente del extracto que resultó más activo en el cernimiento de la actividad antiinflamatoria, el extracto de diclorometano de hojas. La  $DI_{50}$  que arroja la curva dosis-respuesta es de 0.89 mg/oreja, de acuerdo a la regresión lineal con una  $R^2=0.9547$ . Se comparó el valor de la  $DI_{50}$  obtenida con el de la indometacina, fármaco desinflamatorio utilizado como control positivo, el cual presenta una  $DI_{50}$  de 0.084 mg/oreja (Fig. 14).

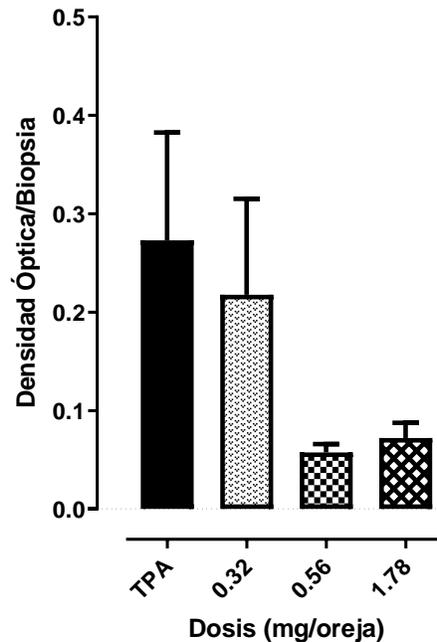


**Figura 14.** Curva dosis-respuesta del extracto de diclorometano de hojas de *C. ehrenbergii* (CEDH), comparada contra la curva dosis-respuesta de la Indometacina, fármaco control positivo.

Al igual que *Cirsium ehrenbergii* en este estudio, también se ha reportado la actividad antiinflamatoria de *Cirsium subcoriaceum* y su principal flavonoide, la pectolarina, pero utilizando el modelo de edema inducido con carragenina en ratas (Martínez-Vázquez *et al.*, 1998). Además, otras especies del género *Cirsium* han sido reportadas con actividad antiinflamatoria, por ejemplo, *Cirsium chanroenicum*, *Cirsium maackii* y *Cirsium japonicum* var. *maackii*. En estas especies se probó la actividad antiinflamatoria de extractos y compuestos aislados de los mismos en modelos de inflamación *in vitro*, en líneas celulares RAW 264.7 (Lim *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2012; Shin *et al.*, 2017). Estos estudios han propuesto que la pectolarigenina, la pectolarina, la luteolina 5-O-glucósido y la cirsimarina son los compuestos que les confieren la actividad antiinflamatoria a estas especies. Sin embargo, el mecanismo de acción por medio del cual estos compuestos actúan no se ha determinado con exactitud.

#### 8.4 Actividad de la enzima MPO

Los resultados indican que la actividad de la enzima MPO va disminuyendo, conforme también disminuye la inflamación, sin embargo, debido a la dispersión de los datos no se obtuvo una diferencia significativa (Figura 15).



**Figura 15.** Actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) en muestras de oreja de ratón con inflamación inducida por TPA y tratadas con el extracto de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) de *C. ehrenbergii*. Cada barra ( $n=4$ ) representa  $\bar{x} \pm \text{EEM}$ . ANOVA ( $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias significativas.

Cuando un agente externo sea biológico, químico o un trauma afecta a las células del organismo y se desencadena el proceso inflamatorio, con este se permite el paso de neutrófilos a la zona afectada, que son células del sistema inmunológico que tienen el fin de destruir al agente externo. Los neutrófilos tienen la función de migrar hacia el sitio del daño o de la inflamación y fagocitar a los agentes externos (p. ej. bacterias) y matarlas por la actividad oxidante del ácido hipocloroso. La MPO es una enzima que requiere de peróxido de hidrógeno para activarse. Éste es el sustrato para la síntesis del ácido hipocloroso a partir de iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los neutrófilos están cargados con la MPO y la almacenan en los gránulos azurófilos. Por esta razón se utiliza a la enzima como marcador bioquímico, para determinar de manera indirecta el contenido de neutrófilos en un tejido inflamado. De manera general cuando hay una disminución del edema también se espera que haya una disminución del contenido de MPO. En estos resultados, que proceden de las muestras utilizadas para la curva dosis-respuesta de

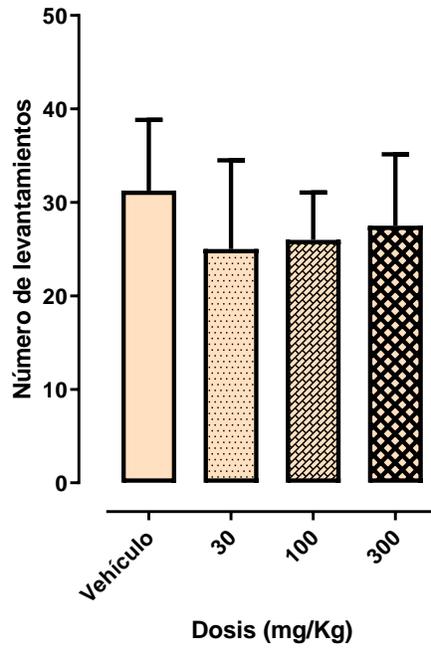
TPA, se puede observar la disminución de la actividad de la enzima conforme se fue aumentando la dosis del extracto administrado, por lo que se considera que la infiltración de neutrófilos también disminuyó.

### **8.5 Pruebas para determinar el perfil neurofarmacológico**

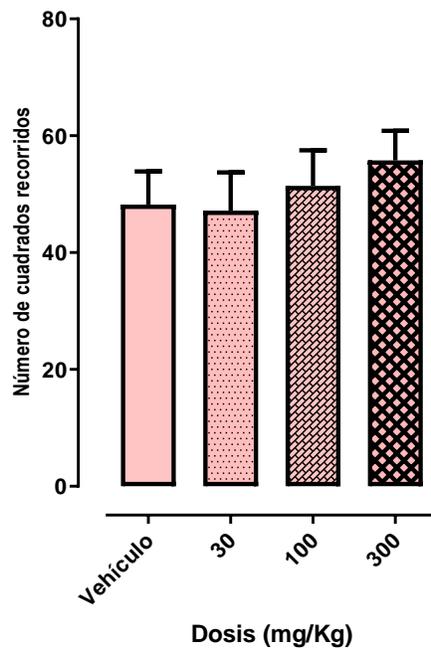
La neurofarmacología conductual se ocupa de la comprensión de los mecanismos neurobiológicos y farmacológicos del comportamiento, así como de las anomalías conductuales que acompañan a los trastornos neuropsiquiátricos, mediante el uso de modelos animales. El objetivo es observar y cuantificar el comportamiento en animales y relacionar este comportamiento con un proceso cerebral específico (Tzschentke, 2008). En este trabajo también se utilizaron diferentes modelos conductuales para determinar si *C. ehrenbergii* tiene actividad sobre el sistema nervioso central. Se utilizaron los modelos de cilindro de exploración, campo abierto, laberinto en cruz elevado y nado forzado para determinar el efecto sedante, sobre la actividad motora espontánea, ansiolítico y antidepresivo, respectivamente. De manera general cuando se realiza el cernimiento de la actividad de diferentes sustancias, los grupos administrados con cada una de ellas pasan por los primeros tres modelos antes mencionados de manera consecutiva. Esto nos lleva a un ahorro en el uso de animales de experimentación. Solo de aquellas sustancias que resulten activas en alguno de los modelos, se determina su  $DE_{50}$ .

En el caso de *C. ehrenbergii*, debido al uso medicinal reportado en el Códice De la Cruz-Badiano en el folio 41r., remedio contra la “sangre negra” (el cual se ha relacionado con la depresión), se decidió evaluar primero el extracto etanólico de hojas, ya que la composición de dicho extracto podría contener una composición similar al remedio que era preparado según el Códice.

De acuerdo a los resultados obtenidos con el modelo de cilindro de exploración, se determinó que el extracto etanólico de las hojas de *C. ehrenbergii* no presenta un efecto sedante (Figura 16). Asimismo, de acuerdo a la prueba de campo abierto, el extracto no afecta la actividad motora espontánea en los ratones (Figura 17).

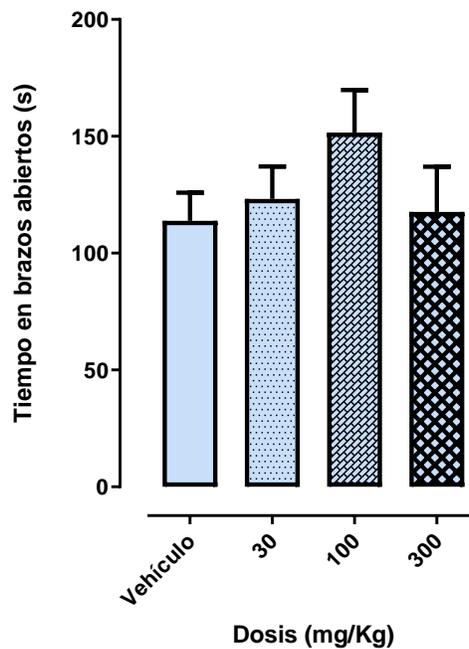


**Figura 16.** Efecto del extracto etanólico de *C. ehrenbergii* sobre el número de levantamientos que realiza el ratón en el modelo de cilindro de exploración. Cada barra (n=4) representa  $\bar{x} \pm EEM$ . ANOVA ( $p < 0.05$ ).

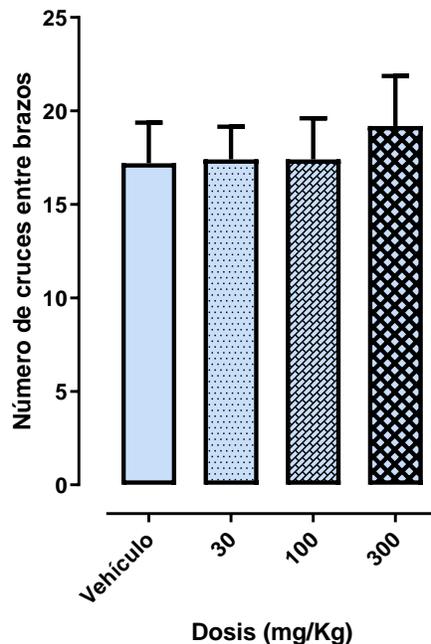


**Figura 17.** Efecto del extracto etanólico de *C. ehrenbergii* sobre la actividad motora espontánea en ratones (modelo de campo abierto). Cada barra (n=5) representa  $\bar{x} \pm EEM$ . ANOVA ( $p < 0.05$ ).

En la prueba de laberinto en cruz elevado, se observa una tendencia en el aumento del tiempo que los ratones permanecen en los brazos abiertos a una dosis de 100 mg/Kg, lo que estaría indicando actividad ansiolítica del extracto (Figura 18). Sin embargo, al realizar la prueba estadística, ésta no arroja diferencias significativas. Debido a la tendencia que se observa se propone evaluar el extracto con una administración subcrónica. Por otra parte, el número de cruces entre brazos del laberinto en cruz elevado que los ratones realizan tampoco muestra diferencias significativas (Figura 19).



**Figura 18.** Efecto del extracto etanólico de *C. ehrenbergii* sobre el tiempo que el ratón pasa en los brazos abiertos del modelo de laberinto de cruz elevada. Cada barra (n=5) representa  $\bar{X} \pm \text{EEM}$ . ANOVA ( $p < 0.05$ ).



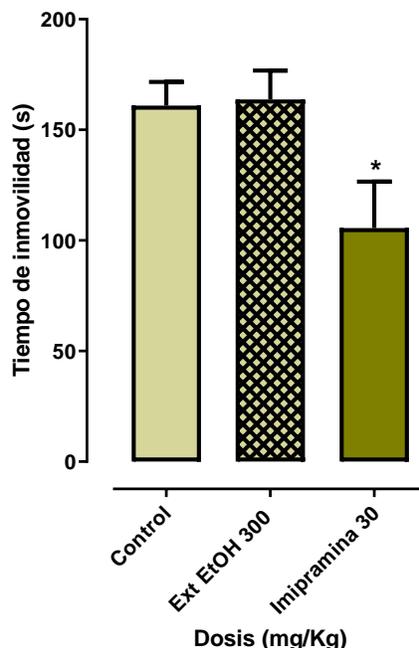
**Figura 19.** Efecto del extracto etanólico de *C. ehrenbergii* sobre el número de cruces entre brazos del laberinto de cruz elevada. Cada barra (n=5) representa  $\bar{x} \pm EEM$ . ANOVA ( $p < 0.05$ ).

El modelo conductual de campo abierto busca determinar si la sustancia administrada en los ratones afecta a la actividad motora espontánea, de acuerdo al número de cuadrados que recorren en el periodo establecido (Gould *et al.*, 2009). En este caso, *C. ehrenbergii* no afecta la actividad de los ratones. Dela Peña y colaboradores en 2014 encontraron que el extracto etanólico de *Cirsium japonicum* tampoco tiene efecto en la actividad locomotora general.

En la búsqueda de nuevas sustancias que puedan servir como futuros fármacos para el tratamiento de padecimientos que afectan el sistema nervioso central como la ansiedad, se ha buscado dirigir las investigaciones hacia fármacos que no produzcan efectos secundarios como sedación o somnolencia. Los efectos sedantes de un fármaco pueden causar deficiencias en el funcionamiento óptimo diario de una persona ya sea en el trabajo o en la escuela, e incluso tienen una mayor predisposición a sufrir incidentes como caídas o accidentes automovilísticos. Por esta razón, las investigaciones se han centrado en la búsqueda de fármacos ansioselectivos (De la Peña *et al.*, 2013). En el resultado obtenido en los modelos de cilindro de exploración y campo abierto, no hubo modificación de la conducta posterior a la administración del extracto etanólico, lo cual resulta importante ya que, como se mencionó anteriormente, ninguna sustancia que se pretenda utilizar con un fin medicinal debe tener efecto sedante y/o sobre la actividad motora de los individuos.

El modelo de laberinto en cruz elevado es la prueba más ampliamente utilizada y aceptada para medir el comportamiento relacionado a la ansiedad en roedores. Es considerado como un modelo válido porque utiliza estímulos ansiogénicos naturales similares a los observados en humanos (Pellow y File, 1986). A pesar de que no se observaron diferencias significativas en esta prueba, los resultados obtenidos pueden compararse con un estudio de De la Peña y colaboradores (2013). En este estudio se probó la actividad ansiolítica del extracto etanólico de *Cirsium japonicum* en ratones, y encontró que a una dosis de 100 y 200 mg/Kg incrementa significativamente el tiempo que pasan los ratones en los brazos abiertos del laberinto y las entradas a ambos brazos (número de cruces). Sin embargo, los resultados obtenidos no siguen una respuesta dependiente de la dosis, ya que a 400 mg/Kg disminuye el número de entradas y el número de cruces entre brazos. Esto es similar a los resultados obtenidos en este estudio, ya que en la Figura 18 se puede observar que el tiempo que pasan los ratones en los brazos abiertos aumenta a una dosis de 100 mg/Kg, sin embargo a 300 mg/Kg disminuye. Este tipo de respuesta De la Peña y colaboradores infieren que puede deberse al complejo farmacocinético y farmacodinámico de los extractos de las plantas, ya que están compuestos de varias sustancias con datos farmacológicos y de dosis-respuesta desconocidos. Ellos suponen que a dosis mayores ocurren interacciones más complejas (entre el extracto y otros sistemas del organismo), lo que provoca que se alteren los efectos ansiolíticos del extracto (De la Peña *et al.*, 2013).

En la prueba de nado forzado, el extracto etanólico de hojas no presentó actividad a una dosis de 300 mg/Kg en comparación con el grupo control al cual solamente se le administró el vehículo, y tampoco con el grupo control positivo al cual se le administró Imipramina a una dosis de 30 mg/Kg. Esto indica que el extracto etanólico de hojas no posee actividad antidepresiva (Fig. 20).



**Figura 20.** Tiempo de inmovilidad de ratones después de la administración del extracto etanólico de *C. ehrenbergii* en la prueba de nado forzado. Cada barra (n=12) representa  $\bar{x} \pm EEM$ . ANOVA ( $p < 0.05$ ).

De la Peña y colaboradores (2014) encontraron que el extracto etanólico de *Cirsium japonicum* posee actividad antidepresiva, ya que a dosis de 200 y 400 mg/Kg disminuye significativamente el tiempo de inmovilidad de los ratones en la misma prueba de nado forzado. Además, determinaron a la luteolina, componente del extracto etanólico de *C. japonicum*, como el compuesto con actividad antidepresiva de forma dosis-dependiente. Este compuesto es el principal componente de *Cirsium japonicum* y estaría involucrado directamente en su efecto antidepresivo.

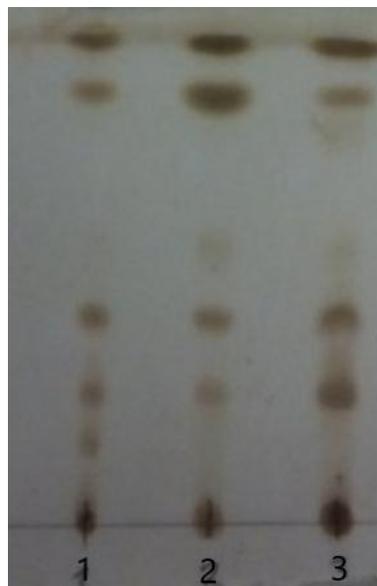
*Cirsium ehrenbergii* y *C. japonicum* a pesar de formar parte del mismo género, pertenecen a hábitats muy diferentes y las condiciones geográficas y ambientales en las que se desarrollan quedan ubicadas a distintas latitudes y longitudes. Se ha estudiado que uno de los factores para la producción de los metabolitos secundarios que poseen las plantas son las condiciones climáticas en las que crecen y se desarrollan, por lo que este podría ser un factor que esté influyendo en los metabolitos secundarios y por lo tanto también en la actividad biológica que ambas especies poseen (Gobbo-Neto y Lopes, 2007).

También se debe considerar que en el código De la Cruz-Badiano, el remedio descrito para la sangre negra (melancolía) se preparaba en conjunto con otra planta ahí nombrada “tlatlanquaye”, actualmente interpretada como *Peperomia galioides*, por lo que el efecto

farmacológico para el que era utilizado pudo deberse a la mezcla de los componentes de ambas plantas e incluso otros elementos que también indica la receta.

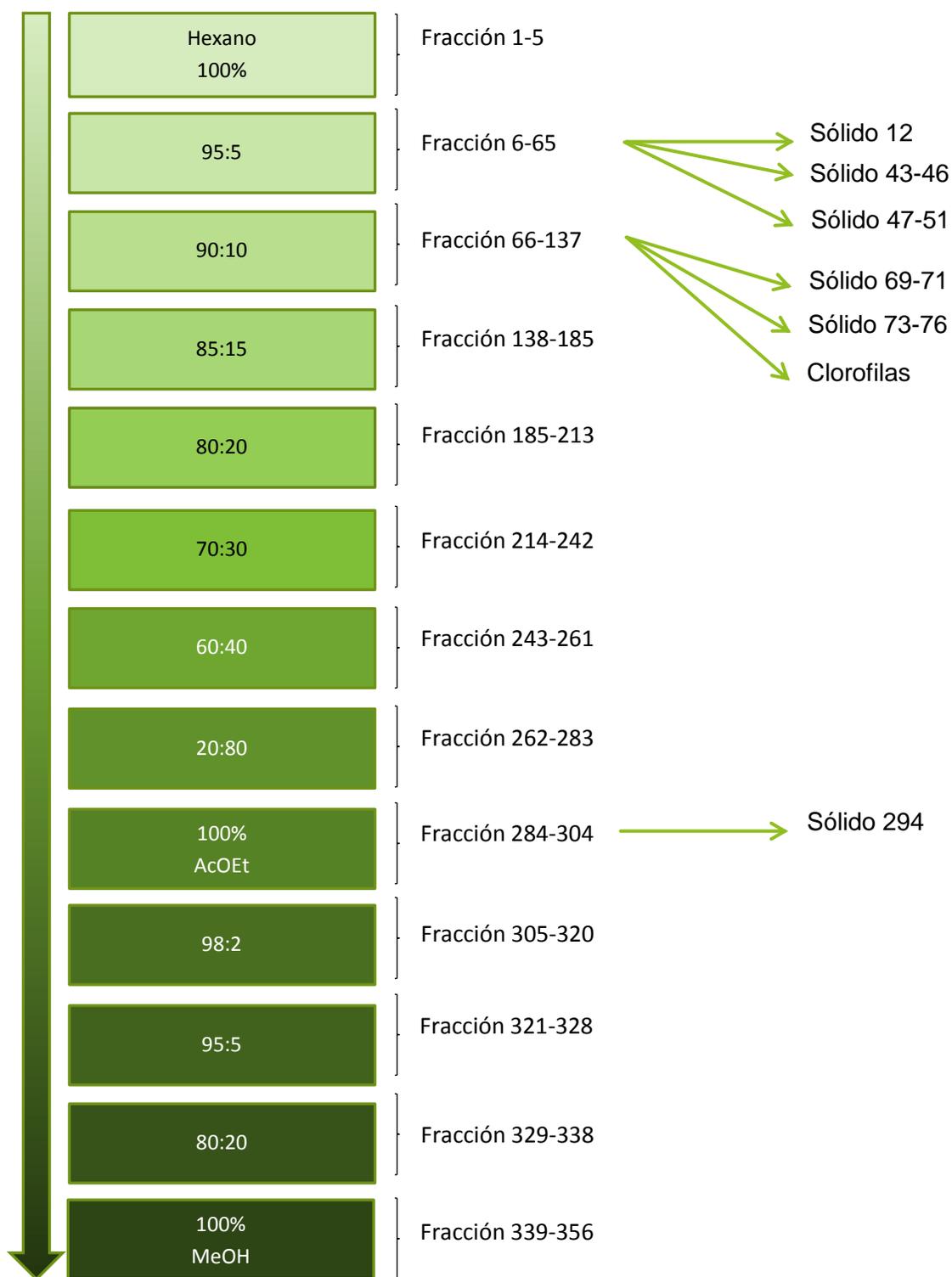
### 8.6 Cromatografía en columna (CC)

Se realizó una cromatografía en capa fina (CCF) de silica gel fase normal con los extractos de diclorometano de hojas, de cabezuelas y de raíces. Se observó que los extractos que resultaron activos en la prueba antiinflamatoria, muestran una similitud cromatográfica (Figura 21). Sin embargo, se decidió estudiar el extracto de diclorometano debido a que presentó una mayor actividad antiinflamatoria y además se tenía en mayor cantidad.



**Figura 21.** Cromatoplaca de silica gel del extracto de diclorometano: 1: extracto de hojas, 2: extracto de cabezuelas, 3: extracto de raíces, mostrando compuestos similares para la muestra 1 y 2. Fase móvil: Hx-AcOEt 9:1.

El siguiente esquema resume el fraccionamiento del extracto de diclorometano de hojas de *C. ehrenbergii* (Fig. 22).



**Figura 22.** Representación de las diferentes polaridades de la fase móvil de la cromatografía en columna y los compuestos obtenidos.

En la fracción 12 de la columna se obtuvo una cera amarilla nombrada con la clave “sólido 12”. Posteriormente, se obtuvieron dos conjuntos de sólidos blancos correspondiente a las fracciones 43-46 y 47-51, los cuales pesaron 8.9 mg y 13 mg respectivamente. Ambos fueron purificados mediante un lavado de los sólidos con hexano. De igual manera se obtuvieron las fracciones 69-71 y 73-76. También correspondía a un sólido blanco que pesó en total 15.2 mg y 9 mg. Finalmente se obtuvo muy poca cantidad de un sólido (2 mg) con una fase móvil de polaridad 100% acetato de etilo, nombrado sólido 294. La cantidad aislada de este sólido no permitió su elucidación química (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Peso de los sólidos de las fracciones aisladas en la columna cromatográfica.

<b>Fracción/Sólido</b>	<b>Peso (mg)</b>
<b>12</b>	<b>7</b>
<b>43-46</b>	<b>8.9</b>
<b>47-51</b>	<b>13</b>
<b>69-71</b>	<b>15.2</b>
<b>73-76</b>	<b>9</b>
<b>294</b>	<b>2</b>

Después de eluir la columna con una fase móvil de 100% acetato de etilo, se seguía observando una coloración oscura en el área donde se aplicó la celita con el extracto, por lo que se decidió utilizar una fase móvil mucho más polar para tratar de que se obtuvieran todos los compuestos que aún pudiera contener el extracto. Se utilizó como fase móvil una mezcla de acetato de etilo-metanol, hasta llegar al 100% de metanol. En dichas fracciones siguientes no se obtuvo ningún compuesto más (Fig. 23).

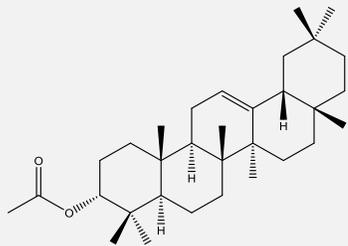
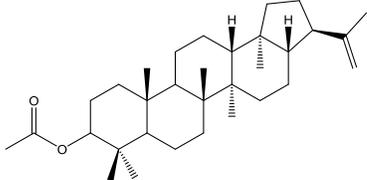
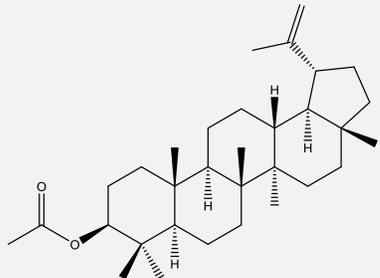


**Figura 23.** Columna cromatográfica al inicio y al final de la elusión con diferentes polaridades.

### **8.7 Identificación de los compuestos aislados**

El sólido 12 se envió al Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y la Conservación del Patrimonio Cultural en el Instituto de Química (LANCIC-IQ) para realizar una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. A través de este análisis se obtuvo la composición de la fracción donde se identificó una mezcla de 3 diferentes triterpenos, esto por medio de la comparación de los espectros de masas con los reportados en la librería del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología 2014 (NIST 2014) (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Composición química del sólido 12 identificada a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en el LANCIC-IQ, UNAM.

Compuesto	Estructura	TR	% Similitud	% Área
Acetato de (3 $\alpha$ )-12-Oleanen-3-il		34.61	95.2	10.93
Acetato de (3 $\beta$ ,21 $\beta$ )-A'-Neogammacer-22(29)-en-3-ol Moretenil acetato		35.62	82.8	17.49
Acetato de (3 $\beta$ )-Lup-20(29)-en-3-ol		35.71	88.8	<b>58.33</b>

De acuerdo a la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas realizada con el sólido 12 y su respectiva comparación con la biblioteca NIST 2014 para su identificación química, se encontró que incluye 3 compuestos triterpénicos: acetato de (3 $\alpha$ )-12-Oleanen-3-il, acetato de (3 $\beta$ ,21 $\beta$ )-A'-Neogammacer-22(29)-en-3-ol, y acetato de (3 $\beta$ )-Lup-20(29)-en-3-ol (acetato de lupeol). De estos tres compuestos, el mayoritario que comprende esta fracción (sólido 12) corresponde al acetato de lupeol, con un área de 58.33% a un tiempo de retención de 35.71. Este compuesto ya ha sido identificado como el constituyente mayoritario en extractos hexánicos de *Cirsium vulgare* y *C. ehrenbergii*, además de reportar a este compuesto como el posible responsable de la actividad hepatoprotectora de dichas especies (Fernández-Martínez *et. al.*, 2018). Además, los tres compuestos ya han sido reportados con actividad

antiinflamatoria mediante diversos métodos *in vivo* e *in vitro* (Nikiema *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2015; Pérez-González *et al.*, 2017). De acuerdo al cernimiento de la actividad antiinflamatoria de los extractos orgánicos de *C. ehrenbergii*, estos compuestos podrían estar influyendo en la actividad antiinflamatoria del extracto de diclorometano de hojas de *C. ehrenbergii*. Por esta razón, se decidió incluirlo en el cernimiento de la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados.

Por otra parte, la fracción del sólido 43-46, que luce como un polvo blanco amorfo, fue identificada como pseudotaraxasterol (o  $\psi$ -taraxasterol). Esta identificación se llevó a cabo mediante Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y su respectiva comparación con la literatura (Reynolds *et al.*, 1986; Jassbi *et al.*, 2016) (Cuadro 6)

El sólido 47-51 que tiene la misma apariencia sólida, blanca y amorfa que el sólido 43-46, se identificó mediante Resonancia Magnética Nuclear como taraxasterol (Reynolds *et al.*, 1986; Jassbi *et al.*, 2016). La cantidad de compuesto aislada en las fracciones correspondientes permitió realizar experimentos bidimensionales que permitieron la identificación de todas las señales. El cuadro 7 muestra los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

La fracción 69-71 también de apariencia polvosa (blanco) fue identificada como mezcla de  $\beta$ -sitosterol con estigmasterol mediante Resonancia Magnética Nuclear y el sólido 73-76 con las mismas características, fue identificado como estigmasterol (Al-Attas *et al.*, 2015).

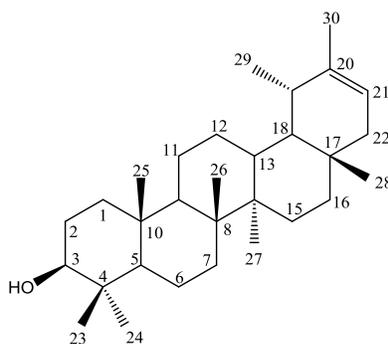
Todos los compuestos identificados ya han sido reportados para otras especies del mismo género *Cirsium* (Jordon-Thaden y Louda, 2003). Sin embargo, esta es la primera vez que se reportan los compuestos para *Cirsium ehrenbergii*.

El  $\psi$ -taraxasterol y taraxasterol son dos triterpenos los cuales también se ha encontrado que poseen actividad antiinflamatoria en modelos de edema inducido en oreja de ratón con aceite de crotón o incluso con TPA (Akihisa *et al.*, 1996; Zitterl-Eglseer *et al.*, 1997). Además, el taraxasterol y el  $\beta$ -sitosterol han sido aislados de tres especies de *Cirsium* (*C. leucopsis*, *C. sipyleum* y *C. eriophorum*), y se probó su actividad antioxidante. También se reportó que el taraxasterol posee fuerte actividad inhibitoria de las enzimas acetil y butiril-colinesterasa (Boğa *et al.*, 2014).

**Cuadro 6.** Número de desplazamiento químico de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de pseudotaraxasterol.

No. de C	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	0.95 m, 1.7 m	38.93, $\text{CH}_2$
2	1.58 m, 1.64	27.20, $\text{CH}_2$
3	3.22, dd, J= 10.85, 5.45	79.19, CH
4	0.7 m	39.03, C
5	0.69	55.46, CH
6	1.38 m, 1.52 m	18.46, $\text{CH}_2$
7	1.38 m, 1.42 m	34.4 $\text{CH}_2$
8		41.23 C
9	1.3 m	50.59 CH
10		37.27 C
11	1.26 m, 1.58 m	21.78 $\text{CH}_3$
12	1.23 m, 1.62 m	27.80 $\text{CH}_2$
13	1.61 m	39.39 CH
14		42.50 C
15	1.01 m, 1.78 m	25.90 $\text{CH}_2$
16	1.25 m	36.87 $\text{CH}_2$
17		34.55 C
18	1.0 m	48.88 CH
19	1.5 m	36.48 CH
20		140.03 C
21	5.3, d, J= 6.83 Hz	119.05 CH
22		42.35 $\text{CH}_2$
23	0.95, s	28.15 $\text{CH}_3$
24	0.76, s	14.90 $\text{CH}_3$
25	0.85, s	16.45 $\text{CH}_3$
26	1.04, s	15.55 $\text{CH}_3$
27	0.88, s	14.27 $\text{CH}_3$
28	0.73, s	17.86 $\text{CH}_3$
29	0.97, d, J=6.3 Hz	22.85 $\text{CH}_2$
30	1.63, s	22.70 $\text{CH}_3$

$^1\text{H}$  RMN 300 MHz y  $^{13}\text{C}$  100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ .

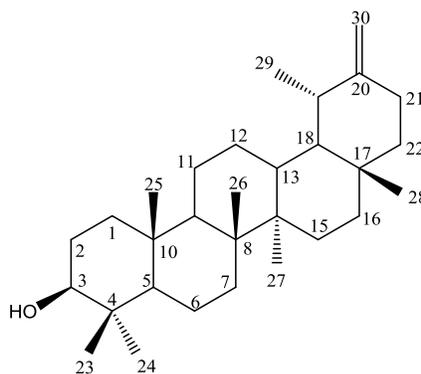


**Figura 24.** Estructura química del pseudotaraxasterol.

**Cuadro 7.** Número de desplazamiento químico de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . de taraxasterol.

No. de C	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	0.95 m, 1.72 m	38.92, CH <sub>2</sub>
2	1.61 m, 1.63 m	27.56, CH <sub>2</sub>
3	3.2 dd, J= 11.38, 4.88	79.19, CH
4		39.03, CH <sub>2</sub>
5	0.7 m	55.52, CH
6	1.41 m, 1.53m	18.45, CH <sub>2</sub>
7	1.37 m, 1.40 m	34.22, CH <sub>2</sub>
8		41.06, C
9	1.31 m	50.65, CH
10	1.33 m, 1.51 m	37.29, C
11	1.1 m, 1.69 m	21.61, CH <sub>2</sub>
12		26.34, CH <sub>2</sub>
13	1.61 m	39.33, CH <sub>2</sub>
14		42.2, C
15	0.94 m, 1.66 m	26.81, CH <sub>2</sub>
16	0.95 m, 1.25 m	38.46, CH <sub>2</sub>
17		34.69, C
18	0.97 m	48.82, CH
19		39.53, CH
20		154.82, C
21	1.30 m, 1.33 m	25.89, CH <sub>2</sub>
22	1.36 m, 1.40 m	39.03, CH <sub>2</sub>
23	0.97 s	28.13, CH <sub>3</sub>
24	0.73 s	15.53, CH <sub>3</sub>
25	0.85 s	16.43, CH <sub>3</sub>
26	1.02 s	16.04, CH <sub>3</sub>
27	0.91 s	14.92, CH <sub>3</sub>
28	0.85 s	19.64, CH <sub>3</sub>
29	1.02 s	25.65, CH <sub>3</sub>
30	4.61 dt, J= 8.26, 2.34	107.29, CH <sub>2</sub>

$^1\text{H}$  RMN 500 MHz y  $^{13}\text{C}$  100 MHz, CDCl<sub>3</sub>.



**Figura 25.** Estructura química del taraxasterol.

### 8.8 Cernimiento de la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados

Con los cuatro sólidos de las fracciones obtenidas en la CC se realizó el cernimiento de la actividad antiinflamatoria empleando el modelo de edema inducido con TPA. Estos fueron el sólido 12, fracción 50-51, fracción 70 y el sólido 294. Todas las fracciones y/o sólidos fueron probados a una dosis de 1 mg/oreja en el modelo de edema inducido con TPA, a excepción del sólido 294 que al ser muy poca cantidad sólo se probó a una dosis de 0.5 mg/oreja. Los resultados obtenidos se resumen en el Cuadro 8.

**Cuadro 8.** Efecto inhibitorio del edema inducido con TPA en ratones de 4 sólidos aislados mediante CC del extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *Cirsium ehrenbergii*. Cada muestra representa el promedio de tres repeticiones (n=3)  $\bar{x} \pm$  EEM. ANOVA (p< 0.05\* y p< 0.01\*\*).

Muestra	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg)	Inhibición (%)
Control		16.84±0.75	
Sólido 12	1	9.43±1.54*	43.98±9.18*
Sólido 47-51 (Taraxasterol)	1	2.17±0.93**	87.13±5.51**
Sólido 69-71 (β-sitosterol+estigmasterol)	1	5.27±2.68**	68.72±15.90**
Sólido 294	0.5	7.60±2.30**	54.87±13.67**

Cabe mencionar que el ψ-taraxasterol y el taraxasterol ya han sido probados mediante el modelo de edema inducido con TPA, obteniendo un porcentaje de inhibición del edema de 77% y 90% respectivamente (Akihisa *et al.*, 1996). El resultado para el taraxasterol es comparable con el obtenido en el presente estudio que corresponde al 87.13% de inhibición, y que además tiene el porcentaje de inhibición más alto de los cuatro sólidos probados. Este compuesto podría ser el responsable de la actividad antiinflamatoria del extracto de diclorometano de hojas. Por otra parte, el ψ-taraxasterol también ha demostrado tener actividad antiinflamatoria, pero en un modelo de inducción de edema con aceite de Crotón (*Croton tiglium* L.) en oreja de ratón (Zitterl-Eglseer *et al.*, 1997).

El  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol son esteroides comunes de las plantas con los cuales se han realizado múltiples estudios que demuestran que poseen diversas actividades biológicas. Estos fitoesteroides han mostrado tener actividad antiinflamatoria en el modelo de TPA y en el modelo de inducción de edema con carragenina, así como también reducen la actividad de la enzima MPO (Navarro *et al.*, 2001; Ammar *et al.*, 2009; Nirmal *et al.*, 2012; Hernández-Valle *et al.*, 2014). El porcentaje de inhibición del edema reportado en este trabajo para la mezcla de estos esteroides es de 68.72%, comparable con el obtenido por Jiménez-Suárez y colaboradores (2016) de 72.7%, donde se aisló la misma mezcla de compuestos de la especie *Hamelia patens* (Rubiaceae) y fue probada en el mismo modelo de edema inducido con TPA.

## IX. CONCLUSIONES

El extracto de diclorometano de las hojas y de las cabezuelas de *C. ehrenbergii* poseen actividad antiinflamatoria según el modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón, con una inhibición de 54.62% y 52.66% respectivamente.

En la curva dosis-respuesta realizada con el extracto de diclorometano de hojas de *C. ehrenbergii*, se obtuvo una  $DI_{50}=0.89$  mg/oreja. Dicha actividad antiinflamatoria está acompañada por una disminución del contenido de MPO lo que indica una disminución de la infiltración de neutrófilos al sitio de inflamación.

Se realizó una CC del extracto de diclorometano de hojas de *C. ehrenbergii* (extracto activo en la actividad antiinflamatoria), mediante la cual se aislaron diferentes triterpenos, entre ellos pseudotaraxasterol y taraxasterol, además de una mezcla de dos fitoesteroides muy comunes en las plantas,  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol.

De los compuestos aislados mediante CC, el taraxasterol resultó tener mayor actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA con un porcentaje de inhibición de 87.13%, por lo que podría ser el mayor responsable de la actividad del extracto.

El extracto etanólico de las hojas de *C. ehrenbergii* no presenta efecto sedante ni afecta la actividad motora espontánea a una dosis de 300 mg/Kg. Por otra parte, con base en los resultados obtenidos en el laberinto en cruz elevado, el extracto no presenta actividad ansiolítica, sin embargo, se observó una tendencia en aumento del tiempo que los ratones

pasan en los brazos abiertos a una dosis de 100 mg/Kg, por lo que se propone evaluarlo mediante una administración subcrónica.

La administración del extracto etanólico a 24, 18 y 1 h antes de la prueba de nado forzado, no disminuye el tiempo de inmovilidad de los ratones, lo que significa que el extracto no posee actividad antidepresiva a una dosis de 300 mg/Kg.

## X. REFERENCIAS

- Akihisa, T., Yasukawa, K., Oinuma, H., Kasahara, Y., Yamanouchi, S., Takido, M., ... & Tamura, T. (1996). Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*, 43(6), 1255-1260.
- Al-Attas, A. A., El-Shaer, N. S., Mohamed, G. A., Ibrahim, S. R., & Esmat, A. (2015). Anti-inflammatory sesquiterpenes from *Costus speciosus* rhizomes. *Journal of Ethnopharmacology*, 176, 365-374.
- Ammar, S., Edziri, H., Mahjoub, M. A., Chatter, R., Bouraoui, A., & Mighri, Z. (2009). Spasmolytic and anti-inflammatory effects of constituents from *Hertia cheirifolia*. *Phytomedicine*, 16(12), 1156-1161.
- Archer, J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal Behaviour*, 21(2), 205-235.
- Berenzon, S., Lara, M. A., Robles, R., & Medina-Mora, M. E. (2013). Depresión: estado del conocimiento y la necesidad de políticas públicas y planes de acción en México. *Salud Pública de México*, 55(1), 74-80.
- Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). **Cardo**. *Cirsium ehrenbergii* Schultz-Bip. Compositae. UNAM. [en línea]. Revisado el 27 de marzo de 2017 en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7054>
- Boğa, M., Yılmaz, P. K., Cebe, D. B., Fatima, M., Siddiqui, B. S., & Kolak, U. (2014). Chemical constituents and biological activities of *Cirsium leucopsis*, *C. siphyleum*, and *C. eriophorum*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 69(9-10), 381-390.

- Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D., & Rothstein, G. (1982a). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*, 78(3), 206-209.
- Bradley, P. P., Christensen, R. D., & Rothstein, G. (1982b). Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood*, 60(3), 618-622.
- Calderón, N. G. & Colin, P. R. (2003). La relación médico-paciente en los trastornos depresivos. *Revista de Neuro-Psiquiatría*, 66(4), 329-334.
- Chung, M. J., Lee, S., Park, Y. I., Lee, J., & Kwon, K. H. (2016). Neuroprotective effects of phytosterols and flavonoids from *Cirsium setidens* and *Aster scaber* in human brain neuroblastoma SK-N-SH cells. *Life Sciences*, 148, 173-182.
- EncicloVida-CONABIO. (2019). Cardo santo (*Cirsium ehrenbergii*). México. Revisado el 22 de febrero de 2019 en: <http://enciclovida.mx/especies/180629-cirsium-ehrenbergii>
- De la Peña, I. J. I., Lee, H. L., Yoon, S. Y., de la Peña, J. B. I., Kim, K. H., Hong, E. Y., & Cheong, J. H. (2013). The ethanol extract of *Cirsium japonicum* increased chloride ion influx through stimulating GABA A receptor in human neuroblastoma cells and exhibited anxiolytic-like effects in mice. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 7(1), 18-23.
- De la Peña, J. B. I., Kim, C. A., Lee, H. L., Yoon, S. Y., Kim, H. J., Hong, E. Y., ... & Cheong, J. H. (2014). Luteolin mediates the antidepressant-like effects of *Cirsium japonicum* in mice, possibly through modulation of the GABA A receptor. *Archives of Pharmacal Research*, 37(2), 263-269.
- De la Cruz, M. (1991). *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*. Vol. I. 2a. ed. México: Fondo de Cultura Económica-Instituto Mexicano del Seguro Social. 258 pp.
- Keil, D. J. (s.f.). Flora of North America: *Cirsium* Miller. FNA, Vol. 19, 20 y 21 Pag. 95. Publicado en internet. Revisado el 4 de diciembre de 2017 en: [http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=1&taxon\\_id=107139](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=107139).
- Fernández-Martínez, E., Díaz-Espinoza, R., Villavicencio-Nieto, M. A., Pérez-Escandón, B. E., Pérez-Hernández, N., Macías, A., ..., & Ponce-Monter, H. A. (2007). Preliminary

phytochemical and biological study of *Cirsium ehrenbergii*. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 50, 162-164.

Fernández-Martínez, E., Jiménez-Santana, M., Centeno-Álvarez, M., Torres-Valencia, J. M., Shibayama, M., & Cariño-Cortés, R. (2018). Hepatoprotective Effects of Nonpolar Extracts from Inflorescences of Thistles *Cirsium vulgare* and *Cirsium ehrenbergii* on Acute Liver Damage in Rat. *Pharmacognosy Magazine*, 13(Suppl 4), S860–S867. doi: 10.4103/pm.pm\_260\_17

Ganzera, M., Pocher, A., & Stuppner, H. (2005). Differentiation of *Cirsium japonicum* and *C. setosum* by TLC and HPLC-MS. *Phytochemical Analysis*, 16(3), 205-209.

García, B. P. (2008). Inflamación. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 102(1), 91-160.

García, D. V., Calcerrada, C. D. G., & García, N. P. (2002). Uso de plantas medicinales en el tratamiento de la ansiedad y la depresión. *FMC-Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, 9(1), 50-56.

Gheno-Heredia, Y. A., Nava-Bernal, G., Martínez-Campos, Á. R., & Sánchez-Vera, E. (2011). Las plantas medicinales de la organización de parteras y médicos indígenas tradicionales de Ixhuatlancillo, Veracruz, México y su significancia cultural. *Polibotánica*, (31), 199-251.

Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30(2), 374-381.

Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009). The open field test. En: *Mood and anxiety related phenotypes in mice* (pp. 1-20). Totowa, N.J.: Humana Press.

Glasby, J. S. (1991). *Dictionary of plants containing secondary metabolites*. Londres: Taylor & Francis, Ltd.

Guzmán-Gutiérrez, S. L., Gómez-Cansino, R., García-Zebadúa, J. C., Jiménez-Pérez, N. C., & Reyes-Chilpa, R. (2012). Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil:

- identification of  $\beta$ -pinene and linalool as active principles. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 673-679.
- Heinrich, M., Robles, M., West, J. E., Ortiz de Montellano, B. R., & Rodriguez, E. (1998). Ethnopharmacology of Mexican asteraceae (compositae). *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 38(1), 539-565.
- Heinze, M. G., & Camacho, S. P. (2011). *Guía clínica para el manejo de la ansiedad*. México: Instituto Nacional de Salud.
- Hernández-Valle, E., Herrera-Ruiz, M., Salgado, G., Zamilpa, A., Ocampo, M., Aparicio, A., ... & Jiménez-Ferrer, E. (2014). Anti-inflammatory effect of 3-O-[(6'-O-palmitoyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl sitosterol] from *Agave angustifolia* on ear edema in mice. *Molecules*, 19(10), 15624-15637.
- Herrera-Ruiz, M., García-Beltrán, Y., Mora, S., Díaz-Véliz, G., Viana, G. S., Tortoriello, J., & Ramírez, G. (2006). Antidepressant and anxiolytic effects of hydroalcoholic extract from *Salvia elegans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(1), 53-58.
- Jassbi, A. R., Firuzi, O., Miri, R., Salhei, S., Zare, S., Zare, M., ... & Baldwin, I. T. (2016). Cytotoxic activity and chemical constituents of *Anthemis mirheydari*. *Pharmaceutical Biology*, 54(10), 2044-2049.
- Jiménez-Suárez, V., Nieto-Camacho, A., Jiménez-Estrada, M., & Alvarado, S. B. (2016). Anti-inflammatory, free radical scavenging and alpha-glucosidase inhibitory activities of *Hamelia patens* and its chemical constituents. *Pharmaceutical Biology*, 54(9), 1822-1830.
- Jordon-Thaden, I. E., & Louda, S. M. (2003). Chemistry of *Cirsium* and *Carduus*: a role in ecological risk assessment for biological control of weeds? *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(12), 1353-1396.
- Jung, H. A., Jin, S. E., Min, B. S., Kim, B. W., & Choi, J. S. (2012). Anti-inflammatory activity of Korean thistle *Cirsium maackii* and its major flavonoid, luteolin 5-O-glucoside. *Food and Chemical Toxicology*, 50(6), 2171-2179.

- Kasper, S., Gastpar, M., Müller, W. E., Volz, H. P., Möller, H. J., Schläfke, S., & Diemel, A. (2014). Lavender oil preparation Silexan is effective in generalized anxiety disorder—a randomized, double-blind comparison to placebo and paroxetine. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *17*(6), 859-869.
- Lai, W. C., Wu, Y. C., Dankó, B., Cheng, Y. B., Hsieh, T. J., Hsieh, C. T., ... & Hunyadi, A. (2014). Bioactive constituents of *Cirsium japonicum* var. *australe*. *Journal of Natural Products*, *77*(7), 1624-1631.
- Lee, W. B., Kwon, H. C., Cho, O. R., Lee, K. C., Choi, S. U., Baek, N. I. & Lee, K. R. (2002). Phytochemical constituents of *Cirsium setidens* Nakai and their cytotoxicity against human cancer cell lines. *Archives of Pharmacal Research.*, *25*(5), 628-635.
- León, R. M., Alvarado, B. A., de Armas, G. J., Miranda, A. L., Varens, C. J., & Cuesta, D. S. J. (2015). Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares: cifras alarmantes. *Revista Finlay*, *5*(1), 47-62.
- Lim, H., Son, K. H., Chang, H. W., Bae, K., Kang, S. S., & Kim, H. P. (2008). Anti-inflammatory activity of pectolarigenin and pectolarin isolated from *Cirsium chanroenicum*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *31*(11), 2063-2067.
- Lister, R. G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl.)*, *92*(2), 180-185.
- Loa-Loza, E., Cervantes-Abrego, M., Durand-Smith, L., & Peña-Jiménez, A. (1998). Usos de la Biodiversidad. En: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). *La diversidad biológica de México: Estudio de País, 1998* (pp. 103-154). México. Revisado el 11 de febrero de 2019 en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/divBiolMexEPais5.pdf>
- Martínez-Vázquez, M., Apan, T. O. R., Lastra, A. L., & Bye, R. (1998). A comparative study of the analgesic and anti-inflammatory activities of pectolarin isolated from *Cirsium subcoriaceum* and linarin isolated from *Buddleia cordata*. *Planta Medica*, *64*(02), 134-137.

- Matulevich, P. J. A., Gil, A. E., & Ospina, G. L. F. (2016). Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de hojas, flores y frutos de *Bejaria resinosa* Mutis ex L. (Pegamosco). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(3), 332-345. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v21n3/pla08316.pdf>
- Miño, J., Gorzalczany, S., Moscatelli, V., Ferraro, G., Acevedo, C., & Hnatyszyn, O. (2002). Actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de *Erythrina crista-galli* L. (" Ceibo"). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 21(2), 93-98.
- Molina-Mendoza, J., Galván-Villanueva, R., Patiño-Siciliano, A., & Fernández-Nava, R. (2012). Plantas medicinales y listado florístico preliminar del municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo, México. *Polibotánica*, (34), 239-271.
- Navarro, A., De Las Heras, B., & Villar, A. (2001). Anti-inflammatory and immunomodulating properties of a sterol fraction from *Sideritis foetens* Clem. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24(5), 470-473.
- Nazaruk, J., & Gudej, J. (2003). Flavonoid compound from the flowers of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 60(1), 87-90.
- Nikiema, J. B., Vanhaelen-Fastré, R., Vanhaelen, M., Fontaine, J., De Graef, C., & Heenen, M. (2001). Effects of antiinflammatory triterpenes isolated from *Leptadenia hastata* latex on keratinocyte proliferation. *Phytotherapy Research*, 15(2), 131-134.
- Nirmal, S. A., Pal, S. C., Mandal, S. C., & Patil, A. N. (2012). Analgesic and anti-inflammatory activity of  $\beta$ -sitosterol isolated from *Nyctanthes arbortristis* leaves. *Inflammopharmacology*, 20(4), 219-224.
- Ocegueda, S., Moreno, E., & Koleff, P. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *Biodiversitas-CONABIO*, 62, 12-15.
- OMS. (2016). La inversión en el tratamiento de la depresión y la ansiedad tiene un rendimiento del 400%. Comunicado de prensa. Revisado el 20 de marzo de 2019 en: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/depression-anxiety-treatment/es/>

- OMS. (2017). Día Mundial de la Salud Mental 2017. La salud mental en el lugar de trabajo. Revisado el 20 de marzo de 2019 en: [https://www.who.int/mental\\_health/world-mental-health-day/2017/es/](https://www.who.int/mental_health/world-mental-health-day/2017/es/)
- OMS. (2018). Depresión. Nota descriptiva. Revisado el 20 de marzo de 2019 en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/depression>
- Ortiz, G. S. (2017). *El uso de plantas alimenticias en el Valle de México y su periferia: Un estudio de cambios, persistencias y pervivencias prehispánicas durante la Época Colonial*. (Tesis de Maestría, Arqueología). El Colegio de Michoacán A. C., Centro de Estudios Arqueológicos. México, 288 pp.
- Oviedo-Chávez, I. (2007). *Obtención de agentes antiinflamatorios y citotóxicos a partir de modificaciones químicas a los ácidos masticadienoico y 3-epimasticadienolico*. (Tesis doctoral, Ciencias Químicas). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Park, H. K., Yoon, S. Y., Choi, J. H., Ko, H. S., Suh, Y. W., Lee, Y. S., ... & Cheong, J. H. (2006). The antidepressant effects of *Cirsium japonicum* in ICR mice. *Yakhak Hoeji*, 50.
- Pellow, S., & File, S. E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24(3), 525-529.
- Peng-Cheng, L. I. N., Lin-Lin, J. I., Zhong, X. J., Jin-Jie, L. I., Xin, W. A. N. G., Shang, X. Y., & Sheng, L. I. N. (2019). Taraxastane-type triterpenoids from the medicinal and edible plant *Cirsium setosum*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 17(1), 22-26.
- Pérez-Escandón, B. E., Villavicencio, N. M. A. & Ramírez, A. A. (2003). *Lista de las plantas útiles del estado de Hidalgo*. México: UAEH, 134 pp.
- Pérez-González, M. Z., Gutiérrez-Rebolledo, G. A., Yépez-Mulia, L., Rojas-Tomé, I. S., Luna-Herrera, J., & Jiménez-Arellanes, M. A. (2017). Antiprotozoal, antimycobacterial, and anti-inflammatory evaluation of *Cnidioscolus chayamansa* (Mc Vaugh) extract and the isolated compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 89-97.

- Porsolt, R. D., Bertin, A., & Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 229(2), 327-336.
- Rahmati, B., Kiasalari, Z., Roghani, M., Khalili, M., & Ansari, F. (2017). Antidepressant and anxiolytic activity of *Lavandula officinalis* aerial parts hydroalcoholic extract in scopolamine-treated rats. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 958-965.
- Redonda-Martínez, R. & Villaseñor-Ríos, J. L. (2011). *Flora del Valle Tehuacán-Cuicatlán*. F89:1-64. México: Instituto de Biología, UNAM.
- Rejón-Orantes, J., Placer-Perdomo, D., & Roldán, G. (2011). Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas. *Universitas Médica*, 52(1), 78-89.
- Reynolds, W. F., McLean, S., Poplawski, J., Enriquez, R. G., Escobar, L. I., & Leon, I. (1986). Total assignment of <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H spectra of three isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR: an investigation of the potential utility of <sup>1</sup>H chemical shifts in structural investigations of complex natural products. *Tetrahedron*, 42(13), 3419-3428.
- Ríos, C. T., Quijano, L., & Reyes-Chilpa, R. (2012). Algunas reflexiones actuales sobre la herbolaria prehispánica desde el punto de vista químico. *Revista Latinoamericana de Química*, 40(2), 41-64.
- Rodríguez, N. F. A., Pérez, J. A. F., Iglesias J. C. A., Gallego R. M., Veiga, B. L., & Cotelo, N. V. (2015). Actualidad de las plantas medicinales en terapéutica. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 4(1), 42-52.
- Rodríguez, D. E. (2018). Técnicas de relajación en el paciente con ansiedad. *XIX Congreso Virtual Internacional de Psiquiatría*. Disponible en: <https://psiquiatria.com/congresos/pdf/1-1-2018-23-pon3%20005.pdf>
- Rzedowski, J. (1978). *Vegetación de México*. México: Editorial Limusa.
- Rzedowski, R. J. & Calderón, R. G. (1995) *Flora del Bajío y de regiones adyacentes*. F32. México: Instituto de Ecología.

- Sánchez-González, A., Granados-Sánchez, D., & Simón-Nabor, R. (2008). Uso medicinal de las plantas por los otomíes del municipio de Nicolás Flores, Hidalgo, México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 14(3), 271-279.
- Shin, M. S., Park, J. Y., Lee, J., Yoo, H. H., Hahm, D. H., Lee, S. C., ...& Kang, K. S. (2017). Anti-inflammatory effects and corresponding mechanisms of cirsimaritin extracted from *Cirsium japonicum* var. *maackii* Maxim. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(14), 3076-3080.
- Soon-Ho, Y., Hyun Jung, K. & Ik-Soo, L. (2003). A polyacetylene and flavonoids from *Cirsium rhinoceros*. *Archives of Pharmacal Research*, 26(2), 128.
- Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., & Fujikura, T. (1983). Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Analytical Biochemistry*, 132(2), 345-352.
- Takaishi, Y., Okuyama, T., Masuda, A., Nakano, K., Murakami, K., & Tomimatsu, T. (1990). Acetylenes from *Cirsium japonicum*. *Phytochemistry*, 29(12), 3849-3852.
- The Plant List. (2013). Version 1.1. Publicado en internet. Revisado el 4 de diciembre de 2017 en: <http://www.theplantlist.org/>
- Tzschentke, T. M. (2008). Behavioral Neuropharmacology. En Binder M.D., N. Hirokawa, & U. Windhorst (Eds.). *Encyclopedia of Neuroscience*. (pp. 369-372). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Valdés, J., Flores Olvera, H., & Ochoterena-Booth, H. (1992). La botánica en el código de la Cruz. En: *Estudios Actuales sobre el Libellus Medicinalibus Indorum Herbis* (pp. 129-180). México: Secretaría de Salud.
- Villalba, E. (2014). Inflamación I. *Revista de Actualización Clínica*, 43(1), 2261-2264.
- Waizel, H. S. & Waizel, B. J. (2009). Algunas plantas utilizadas en México para el tratamiento del asma. *Anales de Otorrinolaringología Mexicana*, 54(4), 145-171.
- Walesiuk, A., Nazaruk, J., & Braszko, J. J. (2010). Pro-cognitive effects of *Cirsium rivulare* extracts in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 129(2), 261-266.

Winyard, P. G., & Willoughby, D. A. (Eds.). (2003). *Inflammation protocols* (Vol. 225). Totowa, NJ: Humana Press.

Young, J. M., Wagner, B. M., & Spires, D. A. (1983). Tachyphylaxis in 12-O-tetradecanoylphorbol acetate-and arachidonic acid-induced ear edema. *Journal of Investigative Dermatology*, 80(1), 48-52.

Zhong, R. F., Xu, G. B., Wang, Z., Wang, A. M., Guan, H. Y., Li, J., ... & Wang, Y. L. (2015). Identification of anti-inflammatory constituents from *Kalimeris indica* with UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS and GC-MS. *Journal of Ethnopharmacology*, 165, 39-45.

Zitterl-Eglseer, K., Sosa, S., Jurenitsch, J., Schubert-Zsilavecz, M., DellaLoggia, R., Tubaro, A., ...& Franz, C. (1997). Anti-oedematous activities of the main triterpene diol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 57(2), 139-144.