

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Estudio fitoquímico y evaluación de las actividades ansiolítica,
sedante y anticonvulsiva de
Dracocephalum moldavica L.”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

Viviana Ramírez Munguía

Ciudad Universitaria,

2006



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.

AGRADECIMIENTOS

Dedico esta tesis con amor y respeto a mi querida familia y amigos:

A mis padres:

Arturo Ramírez Quiroz y Maria Luisa Munguía Rios por darme la oportunidad de existir y compartir su vida a mi lado, por todos los consejos, recomendaciones, sabiduría y confidencias de las cuales he aprendido demasiado, gracias por todo mis queridos padres.

A mis hermanas y hermanos:

Ana, Arturo, Leticia, Hilda, Alma, Marco, Luisa, Javier, Benito, Hugo y Laura porque a su lado compartí la mejor etapa de mi vida, mi infancia, porque son un motivo para continuar por el sendero que me muestra la vida, porque sus vivencias personales me dan la fortaleza necesaria para mejorar en todos los aspectos, gracias.

A mis sobrinas y sobrinos:

Elena, Valeria, Diana, Fernanda, Carlos, Ernesto y Anita por su elocuencia, por hacerme ver que nunca dejamos de ser niños y compartir su infancia a mi lado. Espero que este trabajo los motive a seguir adelante en cualquier camino que decidan elegir.

A mis amigas y amigos:

Adriana, Lizette, Aurora, Sinoe, Emilio, Miguel y Leonardo por su amistad desinteresada, por todas las aventuras que hemos compartido, los consejos, el apoyo profesional y personal que me han brindado, por todo aquello que no puedo mencionar en esta página, gracias a todos.

Por último, al amor de mi vida porque su presencia complementa mi vida y me da ánimos de seguir adelante frente a cualquier circunstancia, gracias.

En realidad todos ustedes saben como es mi forma de ser, sin embargo, para mi, aunque no lo crean son mi prioridad, siempre están conmigo y cada oración es emanada desde mi ser para ustedes con amor y cariño, así como para esa deidad que nunca me olvida, gracias.

A mis profesores:

Victor Ugalde (química analítica instrumental), Sullivan (inmunología aplicada), Blas (química orgánica), Elia Brosla (farmacología), Agustín López Munguía (biosíntesis industria), Isaura (análisis de medicamentos), Homero (biología celular y bioquímica), Armando García Neri (química en la preparatoria 7) y aunque debiera agradecerle a todos los profesores que me impartieron clases en alguna época de mi vida, los mencionó a ustedes porque realmente son una gran influencia en mi vida profesional, por ser de los mejores profesores e investigadores de la UNAM, porque en realidad les interesa la docencia, por su ayuda desinteresada y porque todos ustedes me dieron la oportunidad de demostrarme a mi misma que con esfuerzo, constancia y perseverancia se pueden lograr todas las metas que uno se plantea en la vida, gracias.

A mis asesores de tesis

Dr. Mariano Martínez Vázquez y M. en C. Rosa Estrada Reyes por permitirme trabajar en ambas instituciones, las facilidades proporcionadas para realizar este trabajo de tesis, las recomendaciones y conocimientos aportados, los cuales permitieron mejorar este trabajo de investigación.

Asimismo, agradezco a los profesores Rafael Rion Arriola y Patricia Araceli Peña Álvarez por sus recomendaciones y el tiempo otorgado en la revisión de este trabajo.

Al M. en C. Jorge Cárdenas y al Dr. Rubén del laboratorio 2-8 de Instituto de Química y a la Dra. Lucy del laboratorio de farmacología conductual del INQ, a todos ellos por permitirme trabajar de una u otra manera dentro de sus laboratorios, a todos en general gracias.

A mis compañeros profesores de la ENP 2 por sus consejos y recomendaciones, gracias.

ÍNDICE

	Página
Índice de espectros	III
Lista de acrónimos	IV
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
3. Hipótesis	25
4. Objetivos	26
5. Parte experimental	28
5.1 Colecta e identificación del material vegetal	28
5.2 Evaluación farmacológica	28
5.2.1 Animales	28
5.2.2 Preparación del extracto acuoso de las flores de <i>Dracocephalum moldavica</i> L.	28
5.2.3 Preparación de las disoluciones de <i>Dracocephalum moldavica</i> L. y fármacos	29
5.2.4 Administración del extracto acuoso de <i>Dracocephalum moldavica</i> L.	29
5.2.5 Determinación de la DL ₅₀	30
5.2.6 Prueba del rodillo giratorio o "Rota-Rod"	30
5.2.7 Modelo de conducta animal el tablero con perforaciones o "Hole-Board"	31
5.2.8 Modelo de actividad convulsiva inducida con Pentilentetrazol	32
5.2.9 Prueba de potenciación de sueño inducido con Pentobarbital sódico	33
5.2.10 Análisis estadístico	33

5.3 Estudio fitoquímico	34
5.3.1 Obtención de los extractos orgánicos de las flores de <i>D. moldavica</i> L.	34
5.3.2 Extracto hexánico de las flores de <i>D. moldavica</i> L.	34
5.3.3 Extracto de acetato de etilo de las flores de <i>D. moldavica</i> L.	35
5.3.4 Extracto metanólico de las flores de <i>D. moldavica</i> L.	37
6. Discusión y resultados	39
7. Conclusiones	57
8. Perspectivas	58
9. Espectros	59
10. Bibliografía	79

ÍNDICE DE ESPECTROS

	Página
Espectro 1. Espectrometría de masas por IE de acetina.	59
Espectro 2. Resonancia magnética nuclear de ^1H de acetina.	60
Espectro 3. Resonancia magnética nuclear de ^1H de acetina con D_2O .	61
Espectro 4. Resonancia magnética nuclear de ^{13}C de acetina.	62
Espectro 5. DEPT de acetina.	63
Espectro 6. Espectrometría de masas por FAB^+ de apigenina	64
Espectro 7. Resonancia magnética nuclear de ^1H de apigenina	65
Espectro 8. Resonancia magnética nuclear de ^1H de apigenina con D_2O	66
Espectro 9. Resonancia magnética nuclear de ^{13}C de apigenina	67
Espectro 10. Resonancia magnética nuclear de ^{13}C de apigenina	68
Espectro 11. DEPT de apigenina	69
Espectro 12. Espectrometría de masas por FAB^+ de 7-O-glucosil acetina	70
Espectro 13. Resonancia magnética nuclear de ^1H de 7-O-glucosil acetina	71
Espectro 14. Resonancia magnética nuclear de ^1H de 7-O-glucosil acetina	72
Espectro 15. Resonancia magnética nuclear de ^1H de 7-O-glucosil acetina con D_2O	73
Espectro 16. Espectrometría de masas por FAB^+ de daucosterol	74
Espectro 17. Resonancia magnética nuclear de ^1H de daucosterol	75
Espectro 18. Resonancia magnética nuclear de ^{13}C de daucosterol	76
Espectro 19. Espectrometría de masas por FAB^+ de la mezcla de ácido corosólico y ácido maslínico	77
Espectro 20. Resonancia magnética nuclear de ^1H de la mezcla de ácido corosólico y ácido maslínico	78

ACRÓNIMOS

AcOEt	Acetato de etilo
GABA	Ácido γ -aminobutírico
D₂O	Agua deuterada
FAB⁺	Bombardeo rápido de átomos
BDZ	Benzodiazepinas
Ca⁺⁺	Calcio
cm	Centímetro
Cl⁻	Cloruro
CDCl₃	Cloroformo deuterado
J	Constante de acoplamiento
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
ccf	Cromatografía en capa fina
δ	Desplazamiento químico
DZ	Diazepam
DEPT	Distortionless Enhancement of Polarization Transfer
DMSO	Dimetil Sulfoxido
DMSO-d₆	Dimetil Sulfoxido Deuterado
d	Doblete
dd	Doble de dobles
DL	Dosis letal
EEG	Electroencefalograma
EM	Espectrometría de masas
°C	Grado centígrado
g	Gramos
Hz	Hertz
OH	Hidróxilo
H	Horas
∫	Integral
ip	Intraperitoneal

[M⁺]	Ion molecular
kDa	Kilodaltones
kg	Kilogramo
ILAE	Liga Internacional contra la epilepsia
MHz	MegaHertz
MeOH	Metanol
µm	Micrómetro
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minutos
NOM	Norma Oficial Mexicana
NP	Número de paradas
NA	Número de asomadas
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
PTZ	Pentilentetrazol
PB	Pentobarbital sódico
K⁺	Potasio
p. desc.	Punto de descomposición
p.f.	Punto de fusión
QSAR	Relación Química Estructura-Actividad
R_f	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singulete
SNC	Sistema Nervioso Central
SSI	Solución Salina Isotónica
TA	Temperatura Ambiente
UV	Ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN

A través del tiempo y en diferentes culturas se ha establecido que un sin número de especies plantas han sido utilizadas tanto con fines curativos como rituales. En la actualidad, el conocimiento sobre las propiedades curativas de las plantas, herencia cultural que se ha transmitido por generaciones, es un punto de partida fiable para la búsqueda y desarrollo de principios activos.

En México, territorio vasto en biodiversidad y riqueza cultural, ha surgido el interés de varias disciplinas por conocer nuestros recursos naturales y en especial por estudiar las plantas utilizadas en las prácticas médicas populares. En este sentido, hoy en día distintos centros de investigación del país tomando como punto de partida conocimiento generado desde épocas prehispánicas llevan a cabo numerosas investigaciones enfocadas a los efectos farmacológicos de las plantas medicinales, así como a la caracterización química y aislamiento de los posibles principios activos.

Por otro lado, a pesar de los grandes avances en el área de síntesis y desarrollo de nuevos fármacos, un gran porcentaje de la población de los países en vías de desarrollo utilizan las plantas medicinales como recurso primario de salud, principalmente para enfermedades infectocontagiosas, deficiencias nutricionales y enfermedades crónico degenerativas.¹ Por lo cual es importante estudiar a través de estudios biológicos y fitoquímicos las plantas usadas en la medicina tradicional que pueden ser de utilidad en la terapéutica moderna.

Hoy en día, debido al ritmo de vida que se impone en las sociedades modernas cada vez es más frecuente trastornos como la ansiedad. Este trastorno del Sistema Nervioso Central, se ha convertido en un problema de salud pública. Generalmente su tratamiento consiste en la prescripción de medicamentos ansiolíticos y/o sedantes principalmente del grupo de las benzodiazepinas.^{2, 3, 4} Sin embargo, una gran parte de nuestra población también utiliza plantas medicinales como alternativa para paliar padecimientos de los “nervios”, “susto” e insomnio.⁵

De aquí que diferentes plantas medicinales son cultivadas y comercializadas para uso exclusivo en el tratamiento de trastornos relacionados con el Sistema Nervioso Central, dentro de las que se puede mencionar a *Hipericum perforatum*, *Agastache mexicana* ssp. *mexicana*, *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana*, *Matricaria chamomilla*, *Valeriana officinalis*, *Ginkgo biloba* y *Dracocephalum moldavica* L. entre otras.⁶

Sin embargo, a pesar de la gran variedad de especies medicinales que se utilizan para tratar este tipo de padecimientos, son escasas las plantas que han sido evaluadas farmacológicamente para conocer los efectos que se les atribuye. Es así como en el Laboratorio de Fitofarmacología del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente” en colaboración con el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, se llevan a cabo estudios farmacológicos y fitoquímicos de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana que puedan tener efectos sobre el Sistema Nervioso Central.

Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo el estudio fitoquímico y la evaluación farmacológica de las propiedades ansiolítica, sedante y antiepiléptica de *Dracocephalum moldavica* L., especie de origen asiático conocida comúnmente en México como toronjil azul o toronjil extranjero. En Asia, esta especie es utilizada como antipirético, demulcente, carminativo y tónico. Sin embargo, la infusión del toronjil azul solo o en combinación con *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* (toronjil morado) y *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* (toronjil blanco) es utilizado en México como tranquilizante nervioso y en el tratamiento de trastornos relacionados con los "nervios".

2. ANTECEDENTES

La familia Lamiaceae comprende alrededor de 4000 especies agrupadas en aproximadamente 220 géneros, siendo una de las familias con mayor número de especies, muchas de ellas son de gran importancia por su contenido de aceites esenciales.⁷

Asimismo, una gran variedad de especies de la familia Lamiaceae se utilizan en la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades causadas por microorganismos, animales ponzoñosos e intoxicación por plantas.

Dentro de la familia Lamiaceae, el género *Dracocephalum* se conforma por 50 especies, las cuales habitan principalmente en las regiones templadas del hemisferio norte de Asia y Europa. Es así como, la especie *Dracocephalum moldavica* Linn se encuentra en la zona occidental templada del Himalaya y Cachemira, a altitudes de 2000 y 2500 metros, extendiéndose hacia el norte de Asia y Europa.

Su cultivo se favorece porque es una planta que genera gran cantidad de semillas, crece rápidamente y no requiere condiciones específicas de crecimiento. Se siembra durante la primavera y florece desde Julio hasta finales de Septiembre; cuando su ciclo de crecimiento se lleva a cabo completamente bajo condiciones soleadas su follaje cambia a amarillo.⁸ Actualmente es cultivada y comercializada de forma sistemática en México y otras partes del mundo.

Dracocephalum moldavica L. es descrita como una planta herbácea perenne de 30 a 60 cm de altura, de tallos cuadrangulares, hojas opuestas, elípticas de 2.5 cm con dientes gruesos, flores bilabiadas de color azul colocadas en espigas de 10 cm. Comúnmente se conoce como bálsamo de Moldavia, cabeza de dragón de Moldavia, Melisa de Moldavia, planta de abeja y en México como toronjil azul o toronjil extranjero.⁹



Figura 1. *Dracocephalum moldavica* Linn.

A continuación se muestra su clasificación taxonómica:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobianta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Dracocephalum* L.

Especie: *Dracocephalum moldavica* L.

Dracocephalum moldavica L. se utiliza en infusión sola o en combinación con el toronjil morado (*Agastache mexicana* ssp. *mexicana*) y el toronjil blanco (*Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana*), combinación conocida en el mercado como “complejo de los tres toronjiles” para tratar enfermedades relacionadas con los “nervios” y tranquilizar a las personas cuando sufre de impresiones fuertes. Es por esta razón que se ha sugerido su uso en el tratamiento de ciertos trastornos del Sistema Nervioso Central.³

En Patna India, las semillas de *D. moldavica* L. son remojadas en agua y molidas, para producir un mucílago opaco que es utilizado para disminuir la fiebre y para calmar y reducir la irritación de la piel. En Persia *D. moldavica* L. se utiliza como carminativo, termino asignado a toda sustancia que sirve para eliminar las flatulencias y la distensión abdominal. Esta propiedad probablemente se le atribuyó porque existen antecedentes de que las especies de la familia Lamiaceae contienen una gran cantidad de aceites esenciales utilizados como carminativos (anís, almendra amarga, hinojo y menta). En Europa la planta es utilizada como tónico, astringente y para curar llagas y heridas.⁶

Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de efectos atribuidos a *D. moldavica* L., no se han realizado estudios de la especie cultivada en México sobre su composición química y el uso terapéutico que se le atribuye en nuestro país.

Antecedentes químicos en el género *Dracocephalum*

Debido a su alto contenido de aceites esenciales las plantas del género *Dracocephalum* también son conocidas como plantas aromáticas, por lo que son de gran importancia en la industria de cosméticos, perfumes y licores.⁵

En diferentes estudios sobre la composición de los constituyentes volátiles de varias especies del género *Dracocephalum*, se han identificado aceites esenciales de tipo terpenoide, siendo más frecuente la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos. Por ejemplo, en un estudio realizado con flores de *D. aucheri* Boiss, especie recolectada en Irán, se describe la presencia de una mezcla de veinte compuestos de los cuales el sabineno, α -tujano (monoterpenos bicíclicos) y la (E,E)-germacrona (sesquiterpeno monocíclico) son los constituyentes más abundantes.¹⁰

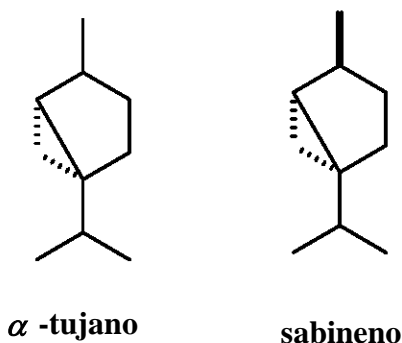


Figura 2. Constituyentes más abundantes de *D. aucheri* Boiss.

En otro estudio realizado con *Dracocephalum kotschy* Boiss, especie recolectada en la región montañosa del noroeste de Irán, se identificó la presencia de citral y mirceno (monoterpenos acíclicos), el cariofileno (sesquiterpeno bicíclico) y el acetato de terpenilo (monoterpeno).¹¹ Mientras que de *Dracocephalum nutans* L., se identificó una mezcla de veinticinco monoterpenos, de los cuales el pinocamfeno, β -pineno, isopinocamfeno, α -felandreno e isopinocamfeol representan a los aceites esenciales más abundantes.¹²

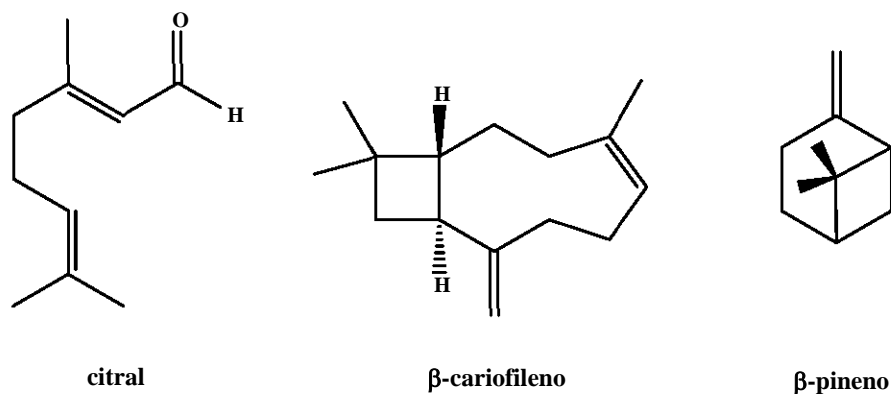


Figura 3. Aceites esenciales más abundantes de *D. kotschyi* B. y *D. nutans* L.

Recientemente de *Dracocephalum komarovi*, especie utilizada para tratar enfermedades de hipertensión e inflamación, se describió el aislamiento de dos nuevos diterpenos, la ciclocouterona y la komaroviquinona, este último compuesto con actividad tripanocida. En este mismo estudio, se identificó por primera vez un nuevo diterpeno de la clase norabietano al cual nombraron dracocephalona A.¹³

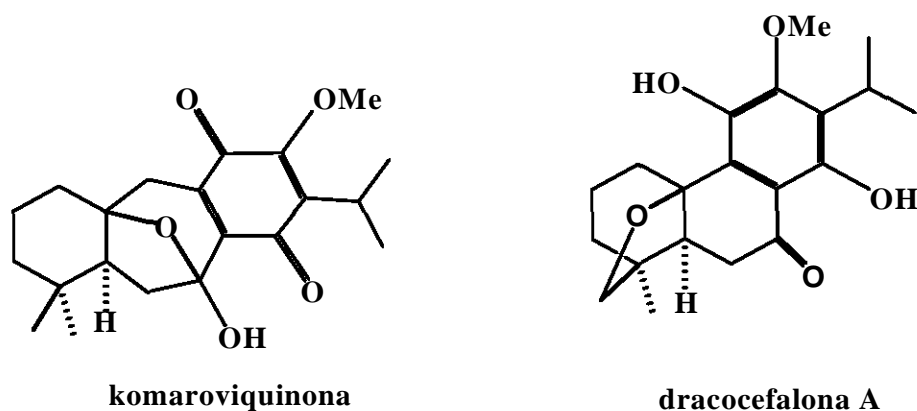


Figura 4. Diterpenos aislados de *D. komarovi*.

En una especie de origen asiático de *Dracocephalum moldavica* L., se describió la presencia de monoterpenos acíclicos, tales como el acetato de geranil, geranial, geraniol, neral y acetato de nerilo.¹⁴

En otro estudio de esta misma especie del cual no se indica su procedencia, se describió la identificación de cinco metabolitos secundarios de tipo flavonoide (0.58 g%)

mediante la técnica de CLAR, de los cuales sólo uno se identificó como apigenina por comparación con una muestra auténtica. En este mismo estudio se identificó la presencia del ácido cafeíco (50.3 mg%), ácido rosmarínico (2.84 g%) y taninos (12.9 g%).¹⁵

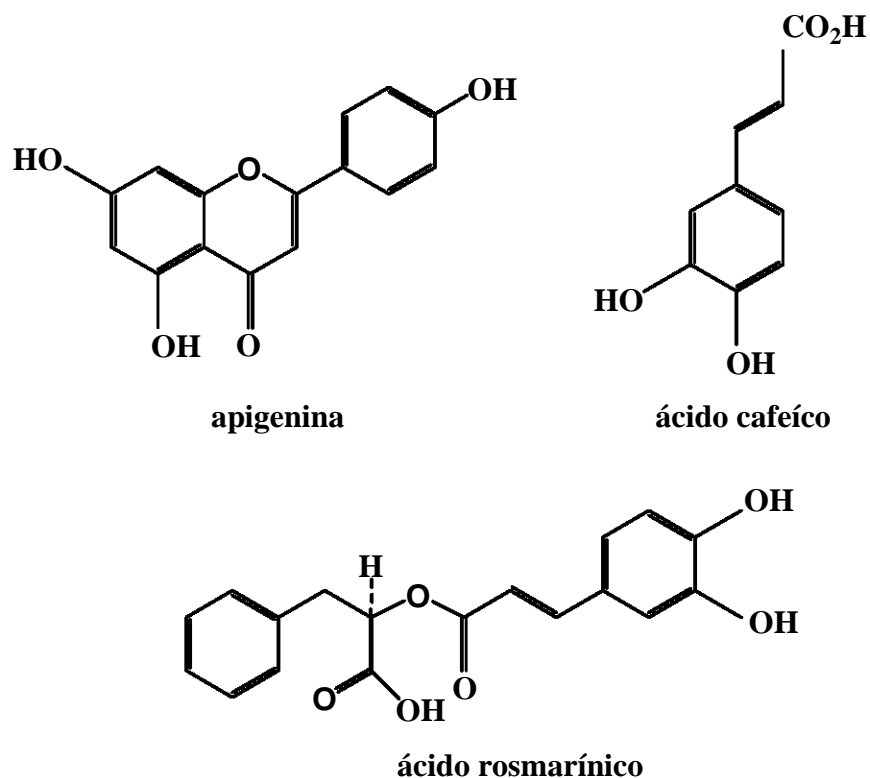


Figura 5. Metabolitos secundarios identificados en *D. moldavica* L.

En un estudio fitoquímico de la planta completa, se describió el aislamiento de dos flavonoides glicosilados, la tilianina y el agastachosido, así como la acacetina y el ácido oleanólico.¹⁶

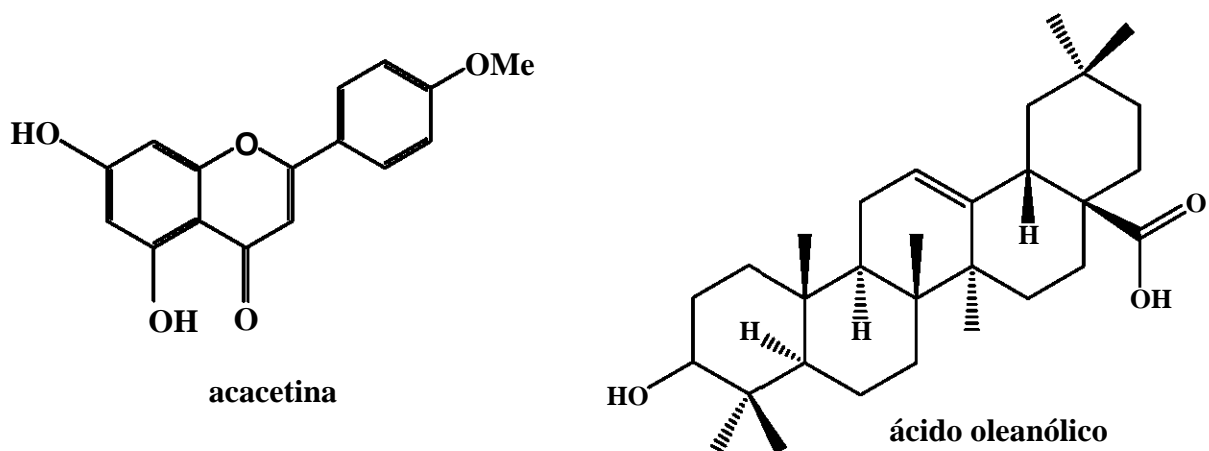


Figura 6. Metabolitos secundarios aislados de *D. moldavica* L.

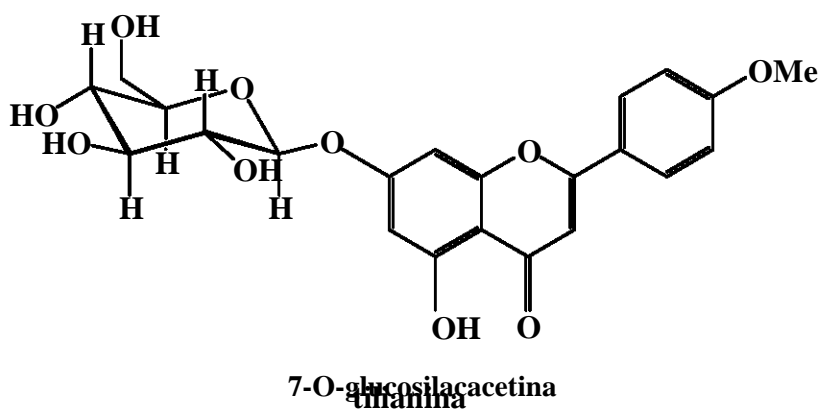


Figura 7. Flavonoide glucosilado aislado de *D. moldavica* L.

En otro estudio realizado a varias especies de los géneros *Nepeta*, *Agastache*, *Dracocephalum* y *Lallemantia*, todas ellas pertenecientes a la familia Lamiaceae, identificaron mediante la técnica de CLAR la presencia de catorce flavonas y dos flavonoles. Dentro de las especies pertenecientes al género *Dracocephalum*, se logró identificar 6 flavonoides de los cuales cinco son flavonas y uno es flavonol (Tabla 1).¹⁷

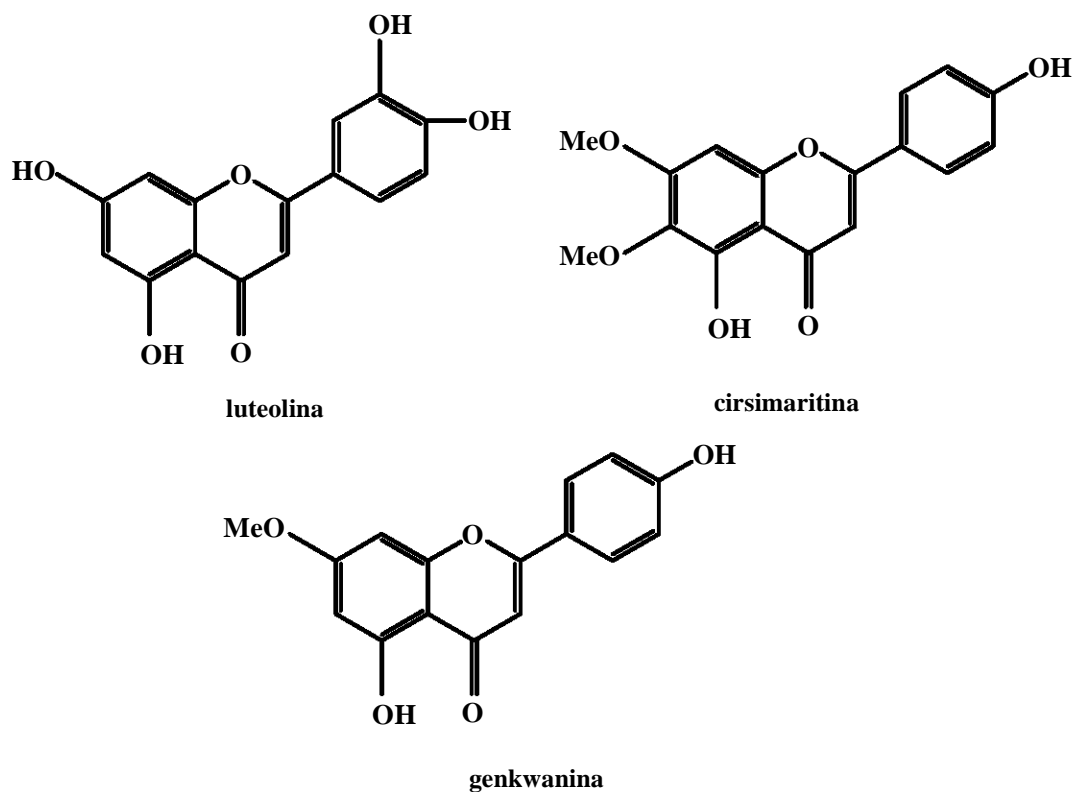


Figura 8. Flavonoides identificados por CLAR en especies del género *Dracocephalum*.

Tabla 1. Flavonoides identificados en especies del género *Dracocephalum*.¹⁷

Especie	5,7-diOH flavona	5-OH-7-OMe flavona	5-OH-6,7-diOMe flavona	5-OH-6,7,8-triOMe flavona	Flavonol-3-Me éter
<i>Dracocephalum grandiflorum</i>	Luteolina (5,7,3',4'-tetrahidróxiflavona)		Cirsimaritina (5,4'-dihidróxi-6,7-dimetoxiflavona)		
	Apigenina (5,7,4'-trihidróxiflavona)				
<i>Dracocephalum kotschyii</i>	Luteolina (5,7,3',4'-tetrahidróxiflavona)	Genkwanina (5,4'-dihidróxi-7-metoxiflavona)	Cirsimaritina (5,4'-dihidróxi-6,7-dimetoxiflavona)	Xantomicrol (5,4'-dihidróxi-6,7,8-metoxiflavona)	Kamferol-3-metiléter (5,7,4'-trihidróxilflavanol-3-metiléter)

Generalidades sobre flavonoides

Los flavonoides constituyen un extenso grupo de metabolitos secundarios que se encuentran distribuidos en la naturaleza en forma de glicosidos o agliconas. Hasta la fecha se han identificado más de 4000 flavonoides en plantas vasculares y su proporción varía según el tipo de planta, edad, condiciones de crecimiento y ubicación geográfica.¹⁸

Los flavonoides son metabolitos secundarios fenólicos de bajo peso molecular, constituidos por un núcleo principal de 15 átomos de carbono $C_6C_3C_6$. Su estructura base se caracteriza por tener dos anillos aromáticos (anillo A y B) unidos por una cadena de tres átomos de carbono. La variación en el estado de oxidación en la cadena de tres átomos de carbono determina las propiedades y el tipo de compuesto. Por tanto, estos metabolitos secundarios se pueden clasificar con base a su estructura química en flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles (catequinas), antocianinas, isoflavonas, dihidroflavonoles y chalconas.¹⁹

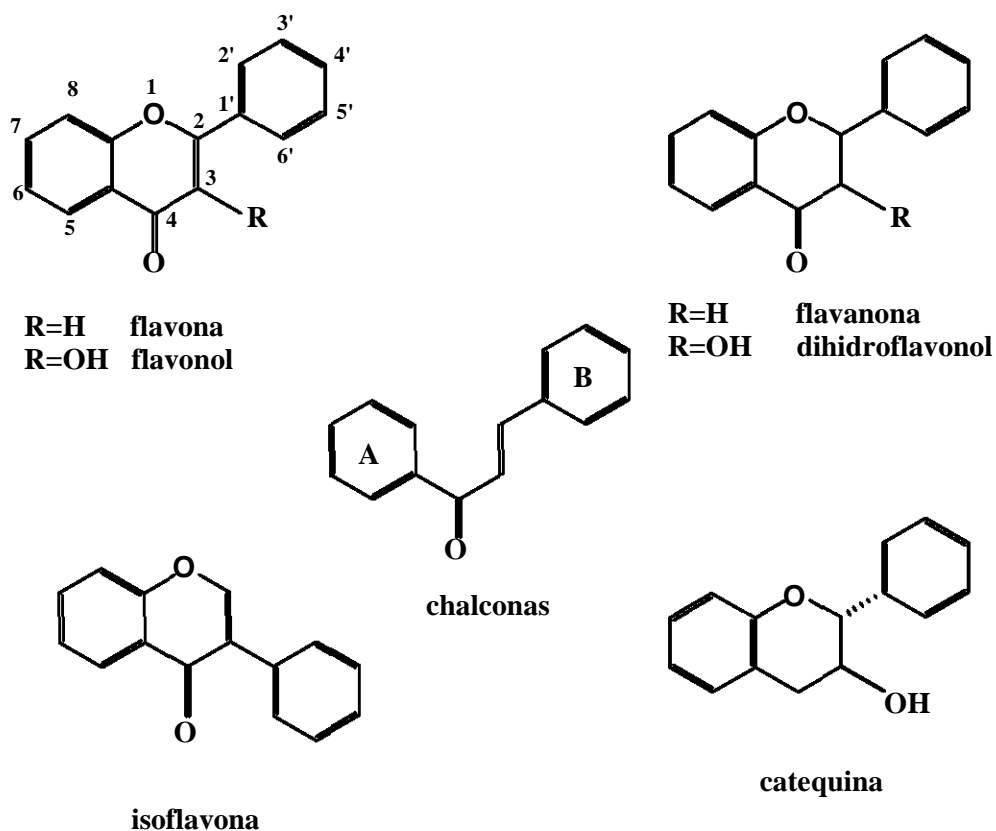


Figura 9. Estructura química de los flavonoides.

Los flavonoides generalmente presentan en el anillo A grupos hidróxilo en las posiciones 5 y 7, mientras que en el anillo B el grupo hidróxilo generalmente se encuentra en la posición 4' o bien en las posiciones 3' y 4'. Estos compuestos también se encuentran en la naturaleza como flavonoides glicosilados, en donde la sustitución por carbohidratos puede ser en cualquiera de las posiciones antes mencionadas.

La biosíntesis de los flavonoides se realiza a través de una ruta mixta, que comprende tanto a la ruta del ácido shikímico como a la ruta del acetato-malonato. El intermediario común a todos los flavonoides es la chalcona, su formación ocurre por condensación tipo Claisen entre p-cumaril-CoA (C_6C_3) con tres unidades de malonil-CoA (C_6), y a partir de éste derivan los diferentes tipos que existen.^{16, 17}

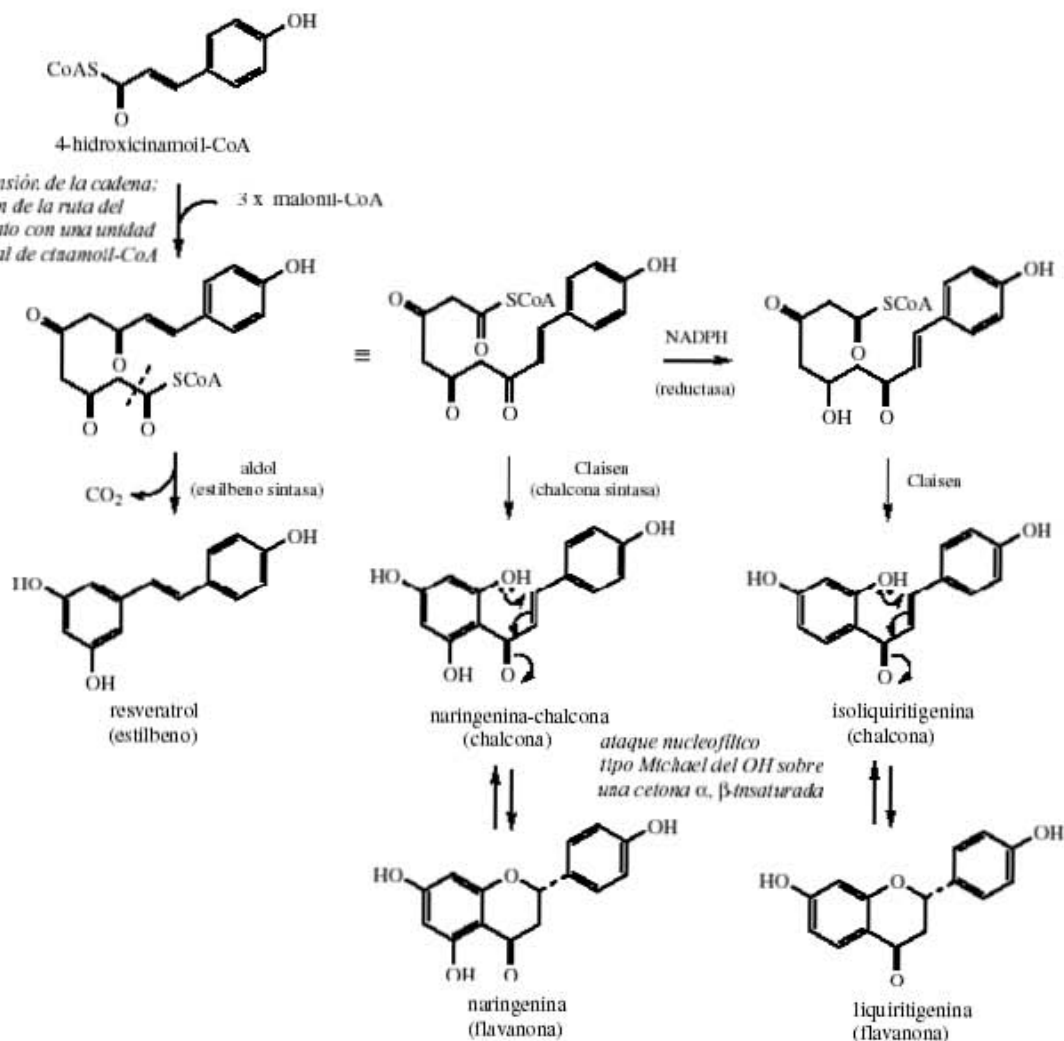


Figura 10. Ruta metabólica de los flavonoides.

Actualmente en las especies de la familia Lamiaceae se han identificado 147 flavonoides libres o agliconas diferentes, siendo las flavonas las de mayor abundancia (60 %) seguido por los flavonoles (16 %) y flavanonas (20 %), mientras que los dihidroflavonoles y las chalconas son los menos frecuentes (2 %). En las especies de esta familia no se ha descrito la presencia de isoflavonas.¹⁶

En las plantas este tipo de metabolitos secundarios participan en sus mecanismos de defensa y dependiendo de sus grupos funcionales y grado de oxidación, los flavonoides proporcionan a numerosas flores y algunos frutos una gran variedad de colores. Por ejemplo, las chalconas originan el color amarillo, los flavonoles el color rojo y las antocianinas producen una gama de azul a violeta, lo cual además de influir en la protección contra la radiación UV, la agresión de hongos, parásitos y herbívoros, también originan estímulos que favorecen la polinización por insectos y el cambio de follaje de diversos arboles en el periodo otoñal.

Los flavonoides ejercen diversas acciones bioquímicas y farmacológicas, algunas de ellas sugieren que pueden alterar significativamente la función de múltiples sistemas celulares en mamíferos, de hecho se ha descrito que algunos flavonoides son particularmente beneficiosos como antioxidantes, por sus propiedades como atrapadores de radicales libres y quelatantes de iones divalente. Así es como estos compuestos intervienen en la inhibición de la peroxidación de lípidos, la agregación plaquetaria, la permeabilidad y fragilidad capilar.²⁰

Actualmente, se ha descrito que flavonas como la crisina y la apigenina, así como sus derivados semisintéticos ejercen un efecto ansiolítico sin acción sedante en ratones y los flavonoles como la quercetina e isoquercetina efectos depresores sobre el Sistema Nervioso Central.^{21, 22, 23} Estudios de unión a receptores y análisis teóricos de Relación Química Estructura-Actividad (QSAR) han llevado a postular que algunos de estos metabolitos secundarios, al comportarse como agonistas de alta afinidad para receptores centrales de GABA/BDZ, pueden llegar a formar una nueva familia de ligandos a receptores de GABA/BDZ.^{24, 25}

Aunque se ha descrito para este tipo de metabolitos secundarios una gran variedad de propiedades biológicas, la información sobre su absorción, metabolismo y excreción en el organismo es escasa. En estudios con roedores y humanos, se reportó que la absorción de los flavonoides en el colon es menor que la que se presenta en el intestino delgado. También, se observó que los flavonoides glicosilados no hidrolizados por los microorganismos de la flora normal del tracto gastrointestinal son mejor absorbidos que las correspondientes agliconas y que la unión de estos compuestos a las proteínas de la dieta, es otro factor que puede reducir la absorción de los flavonoides.

Con respecto al metabolismo de los flavonoides, se sabe que se realiza principalmente en los sistemas de enzimas microsómicas hepáticas y la flora intestinal, aunque puede intervenir el riñón y la pared intestinal. Se ha descrito que algunos flavonoides sintéticos que carecen de grupos hidroxilo, sufren reacciones de biotransformación de fase I. Mientras que los flavonoides con grupos hidróxilo sufren reacciones de biotransformación de fase II al conjugarse con el ácido glucurónico, sulfato y glicina.¹⁸

Los flavonoides no absorbidos y los flavonoides conjugados son secretados con la bilis en el intestino, después de la acción bacteriana son absorbidos en el colon y posteriormente metabolizados por enzimas hepáticas. Las principales reacciones bacterianas son la hidrólisis de flavonoides glicosilados y conjugados, así como la ruptura de la aglicona para formar los ácidos fenólicos, los cuales también son absorbidos y excretados en la orina en su forma libre o conjugada con ácido glucurónico o sulfato. Es así, como los flavonoides son excretados de forma inalterada o en sus metabolitos en heces y orina.

Ansiedad

La ansiedad es un impulso vital y necesario que estimula al ser humano a enfrentar situaciones nuevas e inesperadas a lo largo de toda la vida. No obstante, cuando la ansiedad adquiere tal intensidad que llega a interferir en nuestra conducta y actividades cotidianas, es cuando se convierte en un fenómeno patológico susceptible de ser tratado. La angustia, el nerviosismo, la inseguridad, la inquietud, la tensión, el temor o miedo son algunas vivencias que se relacionan estrechamente con la ansiedad.²⁶

La ansiedad se puede describir como una emoción compleja en la que coexisten, en proporción diversa, diferentes signos y síntomas. Generalmente, se percibe como un sentimiento penetrante de aprensión, temor o angustia, frente a algo que pueda amenazar la propia autoestima o la propia seguridad. También, se presenta un estado de irritabilidad que puede llegar a la pérdida de la capacidad de concentración, así como, un conjunto de síntomas somáticos que afectan en grado variable a los diversos órganos y aparatos (palpitaciones, taquicardia, opresión precordial, fatiga, micciones frecuentes, rubor, cefalea, mialgias e insomnio).²⁶

Por lo tanto, la ansiedad patológica es aquella que resulta excesiva o desproporcionada respecto al estímulo que la provoca, aparece de manera muy frecuente o duradera y produce limitaciones de diversa índole en la vida cotidiana de quien la padece, restringiendo sus posibilidades de adaptación al entorno. La ansiedad patológica, no solamente esta presente en los trastornos de ansiedad, sino que se le asocia frecuentemente con la depresión y con distintas patologías, llamadas hasta no hace mucho tiempo psicósomáticas, como la úlcera péptica, la cefalea, el asma, la bronquitis espasmódica, ciertos trastornos dermatológicos, como la urticaria, el colon irritable y distintas enfermedades relacionadas con el estrés.²⁶

Los trastornos por ansiedad, dependiendo de la intensidad y duración de su sintomatología, se clasifican en trastornos de angustia con agorafobia o sin ella, fobia

específica, fobia social, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno por estrés postraumático y trastorno de ansiedad generalizado.²

Tabla 2. Clasificación de los trastornos por ansiedad.²

TRASTORNO	SÍNTOMAS CARACTERÍSTICOS
Ansiedad generalizada	Aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria, exploración y vigilancia, aprehensión, impaciencia, micción frecuente, malestar gástrico, boca reseca y preocupación de carácter excesivo y persistente durante al menos seis meses.
Angustia con agorafobia	Crisis de angustia y agorafobia de carácter recurrente e inesperado que causan síntomas similares a los que se presentan en la ansiedad generalizada.
Fobia específica	Similares a la ansiedad generalizada, surgen como respuesta a la exposición a situaciones u objetos específicos temidos que conllevan a comportamientos de evitación.
Fobia social	Similares a la ansiedad generalizada, surgen como respuesta a situaciones sociales o actuaciones en público que conllevan a comportamiento de evitación.
Obsesivo compulsivo	Obsesiones que causan los mismos síntomas que se presentan en la ansiedad generalizada, malestar y compulsiones cuyo propósito es neutralizar dicha ansiedad.
Estrés postraumático	Similares a la ansiedad generalizada, se originan ante la reexperimentación de eventos traumáticos y comportamiento de evitación hacia estímulos relacionados con el trauma.

El amplio repertorio de problemas enlazados con la ansiedad constituye uno de los ejes básicos de la psicopatología. En la actualidad los trastornos por ansiedad llegan a afectar del 5 al 10 % de la población general y tienden a incrementarse debido a los factores ambientales estresantes, así como por los problemas socioeconómicos que se presentan en nuestra sociedad. Según datos de la OMS, se estima que 25 % de los pacientes atendidos en la clínica general, presentan síntomas de ansiedad y a lo largo de la vida, el 15 % de la población desarrolla alguno de los trastornos de ansiedad, la mayoría de los cuales son más frecuentes en las mujeres.²⁷

En la ansiedad intervienen diferentes sistemas integradores del cerebro: el sistema reticular activador, que determina el nivel de ansiedad mediante su capacidad de regular el nivel de vigilia o atención; el sistema límbico, es capaz de integrar los mensajes aferentes, dando a estos un contenido afectivo (angustia, coraje, miedo); el hipotálamo que controla el sistema neurovegetativo (taquicardia, sudoración, etc.) y el sistema hipófiso-endocrino, regulando las respuestas fisiológicas.²⁰

Para el tratamiento de la ansiedad se han utilizado diferentes clases de fármacos que actúan en el SNC. Sin embargo, su uso en este trastorno resulta inconveniente por sus efectos secundarios. Entre estos fármacos están los carbamatos del propanediol (*p.ej.*, meprobamato y tibamato), los barbitúricos y otros sedantes no barbitúricos semejantes desde el punto de vista farmacológico. Las desventajas en el uso de estos fármacos se debe primordialmente, a su tendencia a producir grados indeseables de sedación a las dosis requeridas para aliviar la ansiedad; el meprobamato y barbitúricos tienden a producir tolerancia, dependencia física, reacciones graves de abstinencia e intoxicación cuando se toman a dosis excesivas.²⁸

Actualmente, el tratamiento de primera elección para los trastornos de ansiedad se basa en fármacos del grupo de las benzodiazepinas (BDZ) como el diazepam (DZ), porque a pesar de que causan efectos secundarios como letargo, somnolencia, sopor tolerancia y dependencia, se conocen bien sus acciones clínicas debido a su facilidad de absorción y su cinética de distribución y hasta la fecha son fármacos prototipo como ansiolíticos.²⁸

EPILEPSIA

Aunque una gran variedad de factores influyen en la incidencia y prevalencia de las convulsiones, un 5 a 10 % de la población tendrá al menos una convulsión durante su vida; la incidencia es mayor en la primera infancia y al final de la vida adulta. Puesto que las convulsiones son frecuentes, este problema clínico aparece a menudo en la práctica médica y en contextos muy diversos.

Una convulsión (del latín *sacire* “tomar posesión de”) es un fenómeno paroxístico debido a las descargas anormales excesivas e hipersincrónicas de un grupo de neuronas del SNC. Según sea la distribución de las descargas, esta actividad anormal del SNC puede manifestarse de diferentes formas, que van desde una llamativa actividad convulsiva hasta fenómenos de experiencia subjetiva difíciles de advertir por un observador.

En cambio, epilepsia describe un trastorno en el que una persona tiene convulsiones recurrentes debido a un proceso crónico subyacente. Esta definición implica que una persona que ha sufrido una sola convulsión, o convulsiones recurrentes debidas a factores corregibles o evitables, no tiene necesariamente epilepsia. El término epilepsia hace referencia a un fenómeno clínico más que a una sola enfermedad, puesto que existen muchas formas y causas de epilepsia. Sin embargo, entre las muchas causas de epilepsia hay diferentes síndromes epilépticos, cada uno con sus peculiares manifestaciones clínicas y patológicas, que sugieren una etiología específica.

Utilizando la definición de epilepsia como dos o más convulsiones no provocadas, la incidencia de epilepsia es de aproximadamente de 0.3 a 0.5 % en las distintas poblaciones de todo el mundo, habiéndose estimado su prevalencia en 5 a 10 personas por mil.

La clasificación de la convulsión es esencial para orientar el diagnóstico hacia etiologías concretas, para elegir el tratamiento más adecuado y para proporcionar una información que puede resultar vital para el pronóstico. En 1981, la *International League Against Epilepsy* (ILAE) publicó una versión modificada de la Clasificación Internacional

de las convulsiones epilépticas. Este sistema se basa en las manifestaciones clínicas de las convulsiones y en los hallazgos asociados del electroencefalograma (EEG). Otras características potencialmente distintivas, como la etiología o el sustrato celular, no se contemplan en este sistema de clasificación.

La principal característica que distingue las diferentes categorías de convulsiones es si la actividad convulsiva es parcial (sinónimo de focal) o generalizada. Las convulsiones parciales son aquellas en las que la actividad convulsiva queda circunscrita a pequeñas áreas de la corteza cerebral. Las convulsiones generalizadas afectan simultáneamente a amplias regiones cerebrales, de forma bilateral y simétrica. Las convulsiones parciales se asocian frecuentemente con lesiones estructurales del cerebro. Por el contrario, las convulsiones generalizadas pueden originarse por anomalías celulares, bioquímicas o estructurales de distribución más extensas.

Tabla 3. Clasificación de las convulsiones.

1. Convulsiones parciales.

a. Convulsiones parciales simples (con signos motores, sensitivos, autónomos o psíquicos).

b. Convulsiones parciales complejas.

c. Convulsiones parciales con generalización secundaria.

2. Convulsiones primariamente generalizadas.

a. De ausencia (pequeño mal).

b. Tónico-clónicas (gran mal).

c. Tónicas.

d. Atónicas.

e. Mioclónicas.

3. Convulsiones sin clasificar.

a. Convulsiones neonatales.

b. Espasmos infantiles.

GABA y Receptor GABA

El SNC contiene concentraciones altas de algunos aminoácidos, en particular, de glutamato y ácido γ -aminobutírico (GABA), aminoácidos que pueden alterar la actividad neuronal. El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC del mamífero y los receptores para este neurotransmisor se han dividido en dos tipos principales, los receptores ionotrópicos ($GABA_A$ y $GABA_C$) y metabotrópicos ($GABA_B$).

El subtipo de receptor de GABA más relevante, el receptor $GABA_A$, es un receptor de tipo ionotrópico constituido por un canal de cloruro (Cl^-) dependiente de ligando que se abre después de la descarga de GABA a partir de las neuronas presinápticas, originando un incremento en la conductancia del ion Cl^- que hiperpolariza la neurona e inhibe la transmisión sináptica. Mientras que los receptores $GABA_B$ son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G, alterando indirectamente la permeabilidad de la membrana y la excitabilidad neuronal. La activación de proteína G a su vez activa una fosfolipasa A_2 , que libera ácido araquidónico, éste actuando como segundo mensajero, activa una proteína cinasa C, cuya acción final es el cierre de los canales de calcio (Ca^{++}) y la apertura de canales de potasio (K^+) con la consecuente salida de este catión del interior de la neurona y, por lo tanto, su hiperpolarización.^{29, 30}

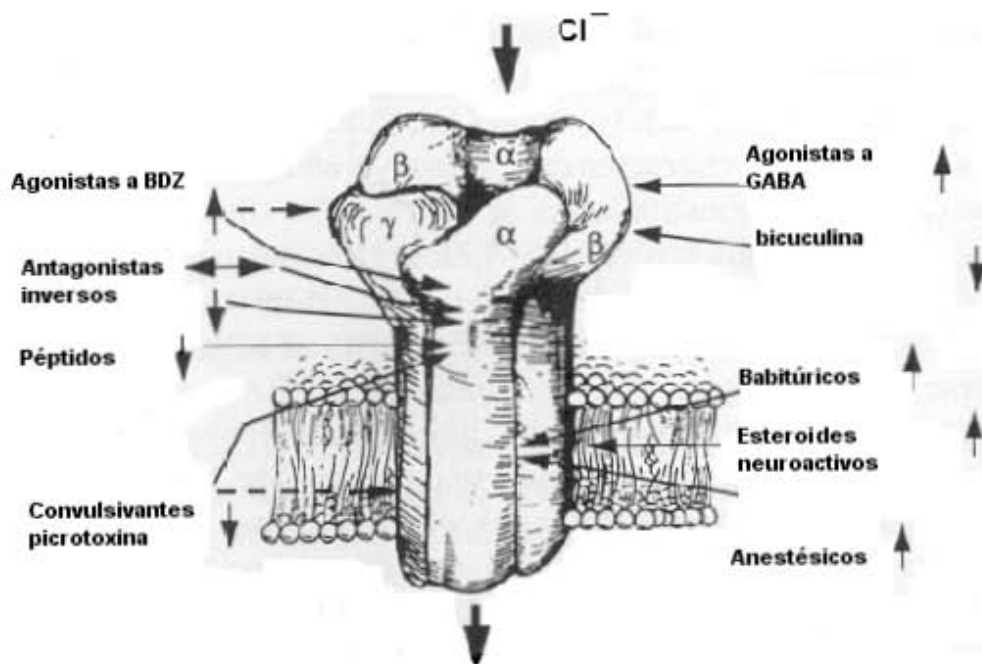


Figura 14. Receptor GABA.

Se ha caracterizado bien la proteína receptora del GABA_A a causa de su gran abundancia y su función en casi todos los circuitos neuronales. El receptor se ha caracterizado, además, de manera extensa en su función como sitio de acción de varios fármacos neuroactivos, tal como las benzodiazepinas y los barbitúricos

El receptor GABA_A consiste de una proteína heteropentamérica de aproximadamente 275 kDa, conformada por dos subunidades α , dos β y una γ . La composición de las subunidades del receptor GABA_A varía según la región del cerebro e incluso entre las diferentes neuronas. Actualmente, se han identificado ocho subunidades polipeptídicas (α , β , γ , δ , ε , π , θ y ρ), de las cuales existen seis isoformas α , cuatro β , cuatro γ , una δ , una ε , una π , una θ y tres ρ . La isoforma α_1 se expresa ampliamente en el cerebro a diferencia de otras subunidades. La isoforma α_6 , se expresa ampliamente en los receptores del cerebelo, no se les une con gran afinidad el DZ pero el agente Ro15-4513 un modulador alostérico negativo que aún es estudiado parece ser selectivo para este tipo de receptores.³²

La coexpresión de las subunidades α y γ es necesaria para observar la respuesta de GABA producida por BDZ, además se ha comprobado que el GABA se une a la subunidad β , mientras que las BDZ se unen a la subunidad α .^{22, 31}

Los receptores GABA que han sido descritos en retina de vertebrados, cerebelo, hipocampo, columna espinal, así como en insectos e incluso en bacteria, se describen como GABA_C, GABA_{NANB} (no A, no B) y GABA _{ρ} (clonados de retina). Estos receptores pueden representar una forma relativamente simple de canales de iones dependientes de ligando, porque se forman de subunidades homooligoméricas a diferencia del receptor GABA_A, el cual está formado por subunidades heterooligoméricas.³²

Fármacos empleados en el tratamiento de ansiedad y epilepsia

El tratamiento farmacológico más empleado en los trastornos de ansiedad consiste principalmente, en agentes sedantes y ansiolíticos del grupo de las benzodiazepinas (BDZ), tal como el diazepam (DZ), clonazepam, clorazepato y alprazolam. Estos fármacos, empleados con frecuencia para tratar ansiedad comparten otras indicaciones terapéuticas, en particular sedación, inducción del sueño y como antiepiléptico.

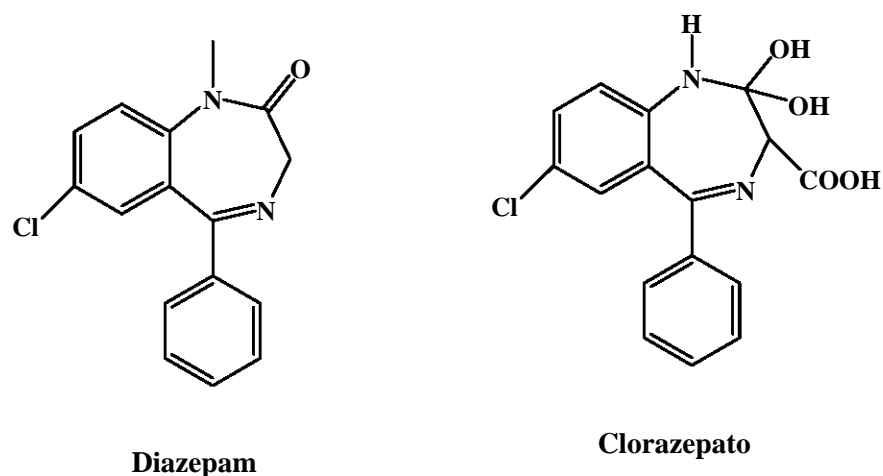
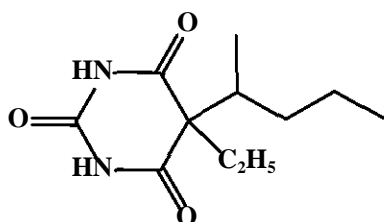


Figura 11. Estructura química de algunas benzodiazepinas empleadas en la ansiedad.

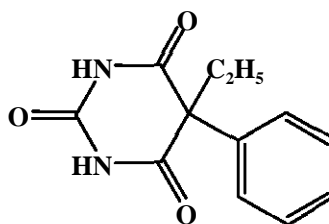
Los receptores GABA/BDZ son los principales blancos moleculares de las BDZ como el DZ, los cuales se fijan directamente al complejo receptor y modulan de manera alostérica la actividad de los canales de Cl^- . A diferencia de otros fármacos, las BDZ no funcionan como compuerta directa de los receptores GABA_A , estas requieren de la presencia de GABA para expresar sus efectos. La activación de receptores GABA_A por agonistas provoca un incremento en la conductancia de iones Cl^- , que es dependiente de ligando y requiere mínimo de la presencia de dos moléculas de GABA. El incremento en la conductancia del Cl^- hiperpolariza la membrana de la neurona generando un potencial de acción inhibitor provocando un efecto sedante, ansiolítico o antiepiléptico.

Para que ocurra la unión con alta afinidad de BDZ, el receptor requiere mínimo del coensamble de una subunidad α , una β y una γ . Sin embargo, las BDZ solo pueden potenciar las corrientes de GABA por combinaciones de subunidades α y γ o β y γ . Las combinaciones de subunidades α y β producen receptores GABA_A funcionales, pero no fijan a las BDZ ni éstas los potencian. Aunque se requiere la subunidad γ para conferir un sitio de fijación de BDZ “completo” sobre los receptores GABA_A, la subunidad α parece controlar la farmacología del sitio receptor de BDZ, mientras que a la subunidad β se une el neurotransmisor GABA.

Otros fármacos de tipo barbitúrico, como el pentobarbital y fenobarbital también empleados en el tratamiento de la ansiedad y epilepsia, incrementan las corrientes de Cl⁻ al prolongar la duración de abertura de los canales individuales. Sin embargo, a diferencia de las BDZ, los barbitúricos tienen efecto en la conductancia del Cl⁻ en ausencia de GABA.



Pentobarbital



Fenobarbital

Figura 12. Estructura química de barbitúricos.

Los barbitúricos intensifican la fijación de GABA a los receptores GABA_A de manera dependiente de Cl⁻ y al mismo tiempo promueve la fijación de BDZ; aumentan las corrientes de Cl⁻ inducidas por GABA al incrementar los periodos durante los cuales ocurre la apertura del canal y no como lo hacen las benzodiazepinas por un incremento de la frecuencia de apertura. Para la acción de los barbitúricos sólo se requieren de subunidades α y β (y no γ). Además, los incrementos inducidos por los barbitúricos en la conductancia

del Cl^- no se ven afectados por la supresión de los residuos de tirosina y treonina en la subunidad β que gobierna la sensibilidad de los receptores GABA_A a la activación por los agonistas.²²

Por otro lado, aunque se cuenta con muchos recursos terapéuticos, el tratamiento de la epilepsia es sintomático, puesto que si bien los fármacos disponibles inhiben las convulsiones, no se cuenta con profilaxis eficaz ni con métodos de curación.

Dentro de los fármacos que producen un efecto anticonvulsivo a nivel del receptor GABA_A , se encuentran compuestos del grupo de los barbitúricos, como el fenobarbital y el pentobarbital. La utilidad clínica del fenobarbital se ve limitada por la producción de efectos sedantes a las dosis requeridas para producir el efecto anticonvulsivo.

La principal aplicación clínica de las benzodiazepinas se refiere a sus efectos sedantes y ansiolíticos. Sin embargo, varias de ellas presentan propiedades anticonvulsivas amplias, pero sólo el clonazepam y clorazepato se han probado para el tratamiento a largo plazo de algunos tipos de convulsiones. Diazepam y lorazepam tienen funciones claramente definidas en la terapéutica del estado epiléptico.

Por otro lado, el pentilentetrazol que ha sido estudiado en humanos y animales de experimentación, así como, la picrotoxina compuesto obtenido del arbusto trepador indígena en Malabar y en Indonesia *Anamirta cocculus*, son fármacos estimulantes enérgicos del SNC. Estos actúan antagonizando el neurotransmisor inhibitor GABA, lo que genera la disminución en la conductancia del ion Cl^- , la despolarización de la membrana neuronal y un potencial de acción excitador que provoca un efecto proconvulsivo y ansiogénico.

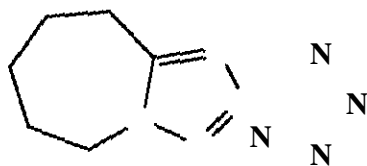


Figura 13. Estructura química del Pentilentetrazol.

3. HIPÓTESIS

Es conocido que *Dracocephalum moldavica* L. se utiliza en la medicina tradicional por sus supuestas actividades tranquilizantes. Por lo que es factible suponer que extractos acuosos de esta especie produzcan un efecto ansiolítico, sedante y/o anticonvulsivo.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar los efectos ansiolítico, sedante y anticonvulsivo de un extracto acuoso y el estudio fitoquímico de los extractos orgánicos de las flores de *Dracocephalum moldavica* L.

Objetivos particulares

Al extracto acuoso:

- Determinar la DL₅₀ del extracto acuoso de las flores de *Dracocephalum moldavica* L.
- Evaluar la coordinación motriz mediante la prueba del rodillo giratorio o "Rota-Rod".
- Determinar el efecto ansiolítico y/o sedante del extracto acuoso de las flores de *Dracocephalum moldavica* L. en el modelo de conducta animal el tablero con perforaciones o "Hole-Board".
- Determinar el efecto anticonvulsivo del extracto acuoso de las flores de *Dracocephalum moldavica* L. en el modelo de actividad convulsiva inducida con pentilentetrazol.
- Determinar el efecto sedante y/o hipnótico del extracto acuoso de las flores de *Dracocephalum moldavica* L. en la prueba de potenciación del sueño inducida con pentobarbital sódico.

A los extractos orgánicos:

- Determinar la composición química del extracto hexánico de las flores de *Dracocephalum moldavica* L.
- Determinar la composición química del extracto de acetato de etilo de las flores de *Dracocephalum moldavica* L.
- Determinar la composición química del extracto metanólico de las flores de *Dracocephalum moldavica* L.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Colecta e identificación del material vegetal

El material vegetal se compró el 8 de noviembre del 2002 en el mercado de plantas medicinales en San José Tlacotitlan, Ozumba, Estado de México, lugar en donde es cultivado de forma sistemática. El ejemplar fue identificado por la M. en C. Eva Aguirre Hernández del Colegio de Posgraduados del Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas de Montecillo, Texcoco, Estado de México. Después de adquirir e identificar el ejemplar en noviembre del mismo año se inició el estudio farmacológico y fitoquímico de la planta.

5.2 Evaluación Farmacológica

5.2.1 Animales

Se utilizaron ratones macho de la cepa Swiss Wester de 6 a 8 semanas de edad, de 28-35 g de peso. Todos los animales son provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría (INP). Se alojaron en grupos de 8 animales en cajas de polietileno de 44 x 21 x 21 cm, en condiciones de ciclo invertido de luz-oscuridad (12:12 h) de manera artificial, en un cuarto con temperatura de 22 ± 2 °C y con libre acceso a agua y alimento. Todos los experimentos se realizaron de 9:00 a 14:00 h. El manejo de los animales se realizó conforme a la Norma Oficial Mexicana para el manejo y cuidado de animales (NOM-062-ZOO-1999) y el comité de ética del INP.

5.2.2 Preparación del extracto acuoso de las flores de *Dracocephalum moldavica* L.

Las flores del toronjil azul se secaron al aire libre durante siete días y se molieron. Una vez seco y molido se pesó con precisión 10 g de las flores de toronjil azul, las cuales se

vertieron en 90 ml de agua destilada en ebullición. La preparación se mantuvo en ebullición durante 10 min. Posteriormente, se filtró, se dejó que el extracto acuoso alcanzara la temperatura ambiente y se liofilizó.

5.2.3 Preparación de las disoluciones de *D. moldavica* L. y fármacos

Las disoluciones se prepararon disolviendo el extracto acuoso liofilizado en solución salina isotónica (SSI) NaCl 0.9 % (J.T. Baker) preparada en el laboratorio con Tween 80 (Sigma) al 1 %, asimismo, las disoluciones de pentobarbital sódico (Sigma) y pentilentetrazol (Sigma) se prepararon disolviéndolos en SSI NaCl 0.9 % con Tween 80 al 1 %. Para la preparación de las disoluciones de DZ (Roche) se utilizó como vehículo una SSI NaCl 0.9 % con polipropilenglicol (Sigma) al 1 %. Todas las disoluciones se prepararon antes de iniciar cada prueba. La disolución limpiadora utilizada en los experimentos fue Extran neutro MAO2 (Merck) al 10 % de etanol.

5.2.4 Administración del extracto acuoso de *D. moldavica* L. y fármacos

Se administraron vía intraperitoneal (ip), las dosis de 1.0, 5.0, 10.0, 100.0 y 200.0 mg/kg del extracto acuoso. La administración de las diferentes dosis se realizó 60 min antes de iniciar cada una de las diferentes pruebas. A los animales control únicamente se les administró SSI NaCl 0.9 %. Los controles positivos se administraron con DZ a 0.5 y 4.0 mg/kg con una latencia de administración de 30 min. Se tomó en cuenta que el volumen de administración es de 10 ml/kg de animal para calcular el volumen de administración de cada una de las disoluciones del extracto liofilizado y fármacos.

5.2.5 Determinación de la DL₅₀

La determinación de la DL₅₀ del extracto acuoso permitió evaluar su toxicidad aguda. Se administraron vía ip las dosis de 1.0, 5.0, 10.0, 100.0, 200.0, 1000.0 y 2000.0 mg/kg del extracto acuoso de *D. moldavica* L, utilizando por dosis grupos de 8 animales. Después de la administración, los animales se observaron individualmente durante 1 h de manera continúa, posteriormente se observaron cada hora hasta cubrir 8 h, y finalmente cada 12 h durante 7 días. Se registró los efectos toxicos generales y el número de muertes.

5.2.6 Prueba del rodillo giratorio o "Rota-Rod"

Este modelo se utilizó para evaluar alteraciones en la coordinación motriz. El modelo es un rodillo de 50 cm de largo por 15 cm de diámetro, dividido en cinco secciones de 10 cm que gira a una velocidad de 16-32 rpm, el modelo fue diseñado en el Laboratorio de Fitofarmacología del INP. La prueba consta de dos etapas, en la primera denominada de entrenamiento, los animales se colocaron sobre el rodillo en series de cinco durante 10 min. Esta etapa concluyó hasta que los animales utilizados no caían en ninguna ocasión del rodillo en el tiempo de observación. En la segunda etapa, a los animales entrenados se les administró vía ip la dosis correspondiente del extracto. Después de 60 min, los animales se colocaron nuevamente en el rodillo giratorio durante 10 min. En este periodo, se evaluó el tiempo de latencia de la primera caída, siendo esta, el tiempo que transcurre desde que se colocó al animal en el aparato hasta que sufre la primera caída y el número de caídas, siendo esta, el número de veces que el animal cae del rodillo giratorio. Antes de iniciar una nueva serie el aparato se limpió cuidadosamente con disolución de Extran neutro MAO2 al 10 % de etanol.

Una disminución en el tiempo de latencia de la primera caída y un aumento en el número de caídas con respecto al grupo control administrado con SSI NaCl 0.9 %, se consideró como una pérdida de la coordinación motriz. Los tiempos se registraron en min.

5.2.7 Modelo de conducta animal el tablero con perforaciones o "Hole-Board"

Este modelo se utilizó para evaluar el efecto ansiolítico y/o sedante. Consiste en un tablero de madera de 60 x 30 cm con paredes de acrílico de 15 cm de altura, el tablero esta dividido en 10 cuadrantes de 15 x 12 cm y tiene cuatro agujeros equidistantes de 2 cm de diámetro, el modelo fue diseñado en el Laboratorio de Fitofarmacología del INP.

La prueba se llevó acabo en un cuarto con luz roja y temperatura controlada (22 ± 2 °C). A los animales se les administró vía ip la dosis correspondiente del extracto. Después de 60 min, se inicio la prueba colocando al sujeto experimental en el centro del tablero y se observó su conducta cuidadosamente durante 5 min. En este periodo se evaluó el tiempo de latencia de la primera exploración, considerado como el tiempo que el animal tarda en asomarse o explorar por primera vez cualquiera de las perforaciones; el tiempo de exploración, siendo esto, el tiempo que el animal mantuvo aproximadamente 1/3 de la cabeza dentro de cualquier perforación; el número de asomadas, considerado como el número total de ocasiones que el animal exploró las perforaciones; el número de paradas, considerado como, el número de veces que el animal se levantó sobre sus patas posteriores y por último la actividad locomotriz o ambulatoria, siendo esta el número de cuadrantes que el animal cruzo durante el periodo de prueba. Antes de introducir un nuevo animal, el tablero se limpio cuidadosamente con disolución de Extran neutro MAO2 al 10 % de etanol.

Los grupos control fueron administrados con SSI NaCl 0.9 % y DZ (0.5 y 4.0 mg/kg). La latencia de administración fue de 60 y 30 min respectivamente.

Los resultados se registraron como el número de asomadas y número de paradas que realizó el animal en 5 min. El tiempo de asomadas y tiempo de latencia de la primera exploración se registró en minutos. La actividad locomotriz se registró como el número de transiciones/5 min.

Una disminución en el tiempo de latencia de exploración y el aumento en el tiempo de asomadas, NA, NP sin modificar la actividad locomotriz, se consideró como un efecto ansiolítico. Mientras que un aumento en el tiempo de latencia de exploración y la disminución en el tiempo de asomadas, NA, NP y actividad locomotriz se consideró como un efecto sedante.^{21, 33, 34, 35, 38}

5.2.8 Modelo de actividad convulsiva inducida con Pentilentetrazol

La evaluación del efecto anticonvulsivo se realizó mediante el modelo químico para la actividad convulsiva inducida con pentilentetrazol (PTZ). Para realizar la prueba, primero se administró la dosis correspondiente del extracto acuoso a evaluar. Después de 60 min, se dio inicio a la prueba administrando vía ip una dosis de 90 mg/kg de PTZ. Inmediatamente después de esta administración, los ratones fueron colocados individualmente en una caja de polietileno con aserrín y se observaron cuidadosamente hasta la recuperación total o muerte de los mismos. En esta prueba se evaluó el tiempo de latencia de la primera convulsión mioclónica, siendo esta, el tiempo que transcurre desde la administración del PTZ hasta el tiempo en que el animal sufre la primera contracción breve del cuerpo, acompañada generalmente por el levantamiento de la cola en forma de gancho, llamada cola de Straub; el tiempo de latencia de la primera convulsión tónica-clónica generalizada, identificada como el tiempo que transcurrió desde la administración del PTZ hasta el momento en que el animal sufrió la primera contracción muscular drástica de todas sus extremidades, esta última es de mayor duración con respecto a la anterior; el tiempo de latencia de muerte, siendo ésta, el tiempo que transcurre desde la administración del PTZ hasta la muerte del animal.y por último el número de animales muertos.

Todos los tiempos se registraron en min. Un incremento en estas variables con respecto al grupo control administrado con SSI NaCl 0.9 % se consideró como un efecto anticonvulsivo.^{21, 36, 37}

5.2.9 Prueba de potenciación de sueño inducido con Pentobarbital sódico

Esta prueba se utilizó para evaluar el efecto sedante e hipnótico. Consistió en dos etapas experimentales, en la primera se administró vía ip la dosis correspondiente del extracto del acuoso. Después de 60 min, se dosificó por la misma vía 30 mg/kg de pentobarbital sódico (PB). Inmediatamente después, el animal se colocó en una caja de polietileno con aserrín y se observó cuidadosamente hasta su recuperación o muerte. En un segundo experimento los animales recibieron el mismo tratamiento excepto que se administró una dosis de 42 mg/kg de PB. En cada caso se evaluó el tiempo de latencia de sedación, considerado como el tiempo que transcurrió desde la administración del PB y la pérdida de la coordinación locomotriz; el tiempo de latencia de hipnosis, siendo este, el tiempo transcurrido desde la administración del PB hasta la inmovilidad total sin la pérdida del "reflejo de enderezamiento". Finalmente, se evaluó el tiempo de sueño, siendo este, el tiempo que transcurre desde la pérdida del "reflejo de enderezamiento" y su recuperación.³⁸

5.2.10 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en todos los experimentos fueron analizados estadísticamente y se expresaron como el promedio \pm error estándar medio. Para determinar si existen diferencias significativas entre el control (SSI) y los grupos experimentales se utilizó el análisis de varianza de una sola vía de Kruskal-Wallis ($p^* < 0.05$ y $p^{**} < 0.001$). El conjunto de datos con un valor de p estadísticamente significativo se analizó mediante la prueba pareada de U de Mann-Whitney.^{38, 39} La comparación estadística entre el porcentaje de muerte inducido por PTZ y los grupos control se realizó mediante la prueba de Fisher. Todos los análisis estadísticos y gráficos se realizaron en los programas SigmaStat 2.0 y SigmaPlot 2.0 respectivamente.

5.3 Estudio Fitoquímico

5.3.1 Obtención de los extractos orgánicos de las flores de *D. moldavica* L.

Se utilizaron 500 g de flores secas y molidas para obtener los respectivos extractos orgánicos. El material vegetal fue extraído por separado y de manera sucesiva con hexano, acetato de etilo y metanol durante 72 h para cada disolvente y a TA. La destilación de los disolventes a presión reducida permitió obtener los diferentes extractos. El rendimiento se calculó tomando en cuenta el peso de cada extracto con respecto al peso seco del material vegetal.

5.3.2 Extracto hexánico de las flores de *Dracocephalum moldavica* L.

El extracto hexánico (10.0 g, 2.0 %) se separó en sus componentes mediante cromatografía en columna al vacío empacada con sílica gel 60G (Aldrich) en una proporción de 1:15 con respecto al peso del extracto. Se utilizó como eluyente Hexano, mezclas de Hexano/AcOEt de polaridad creciente, AcOEt, mezclas de AcOEt/MeOH y finalmente MeOH. Se colectaron 90 fracciones de 50 ml, cada una se concentró por destilación a presión reducida y se reunieron aquellas que mostraron el mismo perfil en ccf.

De las fracciones eluidas con Hexano/AcOEt 9.5:0.5 se aisló un sólido blanco que se purificó por recristalización con MeOH, obteniéndose 500 mg (0.1 %) de β -sitosterol, como un sólido cristalino blanco con p.f. 132-134 °C (p.f. descrito 136-137 °C).⁴⁰ La identificación de este producto se realizó por comparación de R_f en ccf realizada en diferentes sistemas de elución y p.f. con una muestra auténtica.

De las fracciones eluidas con Hexano/AcOEt 9:1 se aislaron 50 mg (0.01 %) de ácido ursólico, como un sólido blanco verdoso con p.f. 212-215 °C (p.f. descrito en MeOH 279-281 °C).⁴⁰ La identificación de este producto se realizó por comparación de R_f en ccf realizada en diferentes sistemas de elución y p.f. con una muestra auténtica.

5.3.2 Extracto de acetato de etilo de las flores de *Dracocephalum moldavica* L.

Al adicionar acetona al extracto de AcOEt (7.0 g, 1.4 %) se precipito un sólido el cual se filtró, de este procedimiento se aislaron 1.5 g (0.3 %) de ácido ursólico como un sólido verde identificado por comparación de R_f en ccf con una muestra auténtica. El residuo acetónico se fraccionó de la misma forma que la antes descrita para el extracto hexánico. Se colectaron 80 fracciones de 100 ml, cada una se concentró por destilación a presión reducida y se reunieron aquellas que presentaron un perfil similar en ccf.

De las fracciones eluidas con Hexano/AcOEt 9.5:0.5 se aislaron 80 mg (0.016 %) de β -sitosterol, como un sólido blanco cristalino que se identificó por comparación de R_f en ccf con una muestra auténtica.

De las fracciones eluidas con Hexano/AcOEt 9:1 se aislaron 150 mg (0.03 %) de ácido ursólico, como un sólido grisáceo que se identificó por comparación de R_f en ccf con una muestra auténtica.

De las fracciones eluidas con Hexano/AcOEt 6:4 se aislaron 20 mg (0.004 %) de **acacetina**, como un sólido de color amarillento con p.f. 258-260 °C (p.f. descrito 263 °C).⁴⁰ Los datos espectroscópicos de este compuesto se describen a continuación:

EM: IE, $[M^+]$, m/z: 284, (C₁₆H₁₂O₅). (Espectro 1).

RMN ¹H: (300 MHz, CDCl₃, DMSO), δ (ppm) (J , multiplicidad, J , asignación): 12.79 (1H, s, OH), 10.24 (1H, s, OH), 7.85 y 7.02 (4H, sistema AA'BB', H-2' y H-6', H-3' y H-5'), 6.54 (1H, s, H-3), 6.44 y 6.26 (2H, sistema AB, 2.1 Hz, H-8 y H-6), 3.89 (3H, s, 4'-OMe). (Espectro 2).

RMN ¹³C: (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (asignación): 181.57 (C-4), 163.78 (C-7), 163.08 (C-9), 161.89 (C-5), 161.41 (C-2), 157.18 (C-4'), 127.41 (C-2', C-6'), 122.86

(C-1'), 113.90 (C-3', C-5'), 103.88 (C-10), 103.29 (C-3), 98.82 (C-6), 93.61 (C-8) y 54.94 (4'-OMe). (Espectro 4).

De las fracciones eluidas con Hexano/AcOEt 2:8 se aislaron 100 mg (0.02 %) de un sólido verde con p.f. 165-168 °C. Los datos espectroscópicos de este sólido permitieron determinar que era una mezcla constituida por los ácidos triterpénicos corosólico y maslínico.

De las primeras fracciones eluidas con AcOEt, aquellas que mostraron el mismo perfil en ccf se reunieron y separaron por cromatografía en placa preparativa. Se utilizó como sistema de elución una mezcla AcOEt/Hexano 1:1, de la fracción con R_f de 0.45 se aislaron 21 mg (0.0042 %) de **apigenina**, como un sólido de color amarillento con p.f. >290 °C (p.f. descrito 352 °C).⁴⁰ Los datos espectroscópicos de este compuesto se describen a continuación:

EM: FAB⁺, [M⁺+1], m/z: 271, (C₁₅H₁₀O₅). (Espectro 6).

RMN ¹H: (300 MHz, CDCl₃, DMSO), δ (ppm) (J, multiplicidad, J, asignación): 12.88 (1H, s, OH), 10.16 (1H, s, OH), 9.74 (1H, s, OH), 7.76 y 6.95 (4H, sistema AA'BB', H-2' y H-6', H-3' y H-5'), 6.50 (1H, s, H-3), 6.43 y 6.26 (2H, sistema AB, 2.1 Hz, H-8 y H-6). (Espectro 7).

RMN ¹³C: (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (asignación): 181.66 (C-4), 164.07 (C-9), 161.42 (C-7), 160.80 (C-5), 160.59 (C-2), 152.26 (C-4'), 127.55 (C-1'), 127.48 (C-2', C-6'), 121.39 (C-3), 115.60 (C-3', C-5'), 102.70 (C-10), 98.76 (C-6) y 93.58 (C-8). (Espectro 9 y 10).

De las fracciones eluidas con AcOEt se aislaron 300 mg (0.06 %) de **daucosterol**, como un sólido blanco con p. desc. 255-257 °C (p. desc. descrito 283-286 °C)⁴⁰ que se identificó por comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas descritas en la literatura.⁴¹

De las fracciones eluidas con AcOEt/MeOH 9:1, se obtuvo por precipitación 25 mg (0.005 %) de un sólido amarillo que de acuerdo a sus características espectroscópicas y su comportamiento en cc fase reversa resultó ser una mezcla de tres compuestos, de los cuales dos son de naturaleza flavonoide.

5.3.4 Extracto metanólico de las flores de *Dracocephalum moldavica* L.

Al adicionar acetona al extracto metanólico (9 g, 1.8 %) se precipitó un sólido de color café que posteriormente se fraccionó por cromatografía en columna en fase reversa. De las fracciones eluidas con MeOH/agua 1:1 se aisló 22 mg (0.0044 %) de **7-O-glucosil acacetina**, como un sólido amarillo con p.f. 235-240 °C (p.f. 259-260 °C).⁴⁰ A continuación se muestran los datos espectroscópicos de este compuesto:

EM: FAB⁺, [M⁺+1], m/z: 447, C₂₂H₂₂O₁₀). (Espectro 12).

RMN ¹H: (300 MHz, DMSO), δ (ppm) (J, multiplicidad, J, asignación): 13.3 (1H, s, OH), 8.07 y 7.14 (4H, sistema AA'BB', H-2' y H-6', H-3' y H-5'), 6.96 (1H, s, H-3), 6.86 y 6.46 (2H, sistema AB, 1.8 Hz, H-8 y H-6), 5.40, 5.07 y 4.62 (4H, s, OH glucosa), 5.07 (1H, d, H-2 glucosa), 3.87 (3H, s, 4'-OCH₃) y 3.74-3.21 (5H, varias señales, protones del anillo de glucosa). (Espectro 13 y 14).

El remanente del extracto metanólico se separó de la misma forma que el extracto hexánico. De las fracciones eluidas con AcOEt se aisló 200 mg (0.04 %) de **daucosterol**, como un sólido blanco con p. desc. 276-280 °C (p. desc. descrito 283-286 °C)⁴⁰ que se identificó por comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas descritas en la literatura. Los datos espectroscópicos obtenidos se muestran a continuación:⁴¹

EM: FAB⁺, [M⁺+23], m/z: 599, (C₃₅H₆₀O₆). (Espectro 16).

RMN ¹H: (200 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm) (J, multiplicidad, J, asignación): 5.33 (1H, s, ancho, H-6), 4.89 (3H, m, OH-2', OH-3' y OH-4'), 4.44 (1H, t, 5.6 Hz, OH-6'), 4.21 (1H, d, 7.6 Hz, H-1') y 3.6 (1H, dd, 11.0, 5.6 Hz, H-6'a). (Espectro 17).

RMN ¹³C: (200 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm) (asignación): 140.46 (C-5), 121.25 (C-6), 100.79 (C-1'), 76.91 (C-3), 76.78 (C-3' y C-5'), 73.47 (C-2'), 70.10 (C-4'), 61.09 (C-6'), 56.19 (C-14), 55.44 (C-17), 49.62 (C-9), 45.14 (C-24), 41.86 (C-13), 36.86 (C-1), 36.22 (C-10), 35.50 (C-20), 33.35 (C-22), 31.42 (C-7 y C-8), 29.28 (C-2), 28.71 (C-25), 27.81 (C-16), 25.41 (C-23), 23.88 (C-15), 22.61 (C-28) , 20.62 (C-11), 19.74 (C-27), 19.12 (C-19), 18.95 (C-26), 18.63 (C-21), 11.79 (C-29) y 11.68 (C-18). (Espectro 18).

De las fracciones eluidas con MeOH se obtuvo 1 g (0.2 %) de un producto viscoso de color ámbar el cual resultó ser por ccf una mezcla compleja, la cual se analizó mediante CLAR lográndose identificar maltosa, xilosa, glucosa, sacarosa y fructosa por comparación con sus tiempos de retención y los tiempos de retención de estándares.

Condiciones del equipo:

Columna: Zorbax carbohidrate; largo 15 cm; diámetro 4.6 mm; tamaño de partícula 5 μm.

Detector: índice de refracción; temperatura 35 °C.

Fase móvil: acetonitrilo/agua 80:20.

Flujo: 1.4 ml/min.

Disolvente de la muestra: agua

6. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Previo a la evaluación farmacológica del extracto acuoso de *Dracocephalum moldavica* L., se realizó la evaluación de toxicidad aguda a las dosis de 1, 5, 10, 100, 200, 1000 y 2000 mg/kg, en esta prueba se observó que los animales administrados con las dosis de 1 a 200 mg/kg del extracto acuoso de *D. moldavica* L. no presentaron efectos tóxicos generales. Mientras que a los que se les administró la dosis de 1000 y 2000 mg/kg presentaron diarrea, irritación abdominal y piloerección. Este efecto se manifestó durante aproximadamente 2 h, después de este tiempo los animales se recuperaron totalmente. A ninguna de las dosis administradas se observó muerte por lo que no fue posible determinar la DL₅₀. Sin embargo, se puede establecer que la dosis mínima para que se produzca la muerte en al menos un animal es mayor de 2000 mg/kg.

Ante la imposibilidad de utilizar humanos como sujetos de experimentación, para estudiar los efectos de nuevos fármacos o principios activos que puedan ser de utilidad en el tratamiento de trastornos de ansiedad y otras afecciones crónicas como la epilepsia, los modelos animales nos proporcionan herramientas metodológicas de gran importancia para la investigación de estos trastornos. El modelo de conducta animal el tablero con perforaciones nos permite evaluar la actividad ansiolítica y/o sedante en animales, basado en la conducta natural de los roedores a explorar zonas desconocidas o novedosas.

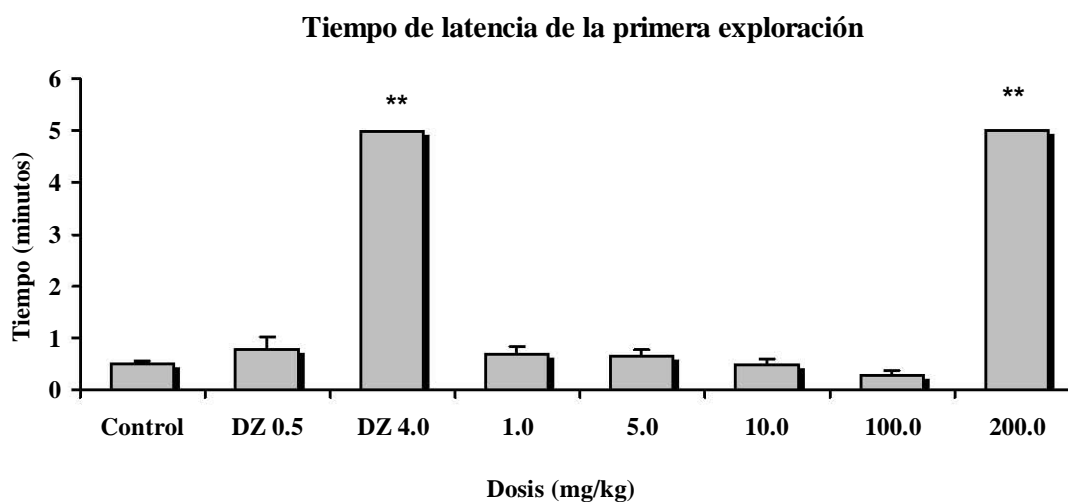


Figura 15. Efecto del extracto acuoso de *D. moldavica* L. en el tiempo de latencia de la primera exploración del modelo tablero con perforaciones o “Hole-Board”. Prueba de U de Mann-Whitney * $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.001$.

Las variables que se evalúan en este modelo son el tiempo de la latencia de la primera exploración, número de paradas (NP), número de asomadas (NA), tiempo de exploración y actividad locomotriz. Una disminución en el tiempo de latencia de exploración y el aumento en el tiempo de asomadas, NA, NP sin modificar la actividad locomotriz, se consideró como un efecto ansiolítico. Mientras que un aumento en el tiempo de latencia de la primera exploración y la disminución en las demás variables se consideró como un efecto sedante.

En la figura 15 se observa que el tiempo de latencia de la primera exploración aumenta a la dosis de 200 mg/kg con respecto a los controles de SSI y DZ 0.5 mg/kg, lo que es considerado como una disminución en la reactividad del sujeto de prueba ante un ambiente novedoso. Este comportamiento es similar al efecto producido por DZ 4.0 mg/kg una benzodiazepina clásica que genera efectos sedantes a dosis mayores (2.0-4.0 mg/kg) y efectos ansiolíticos a dosis bajas (0.5-1.0 mg/kg en ratón).

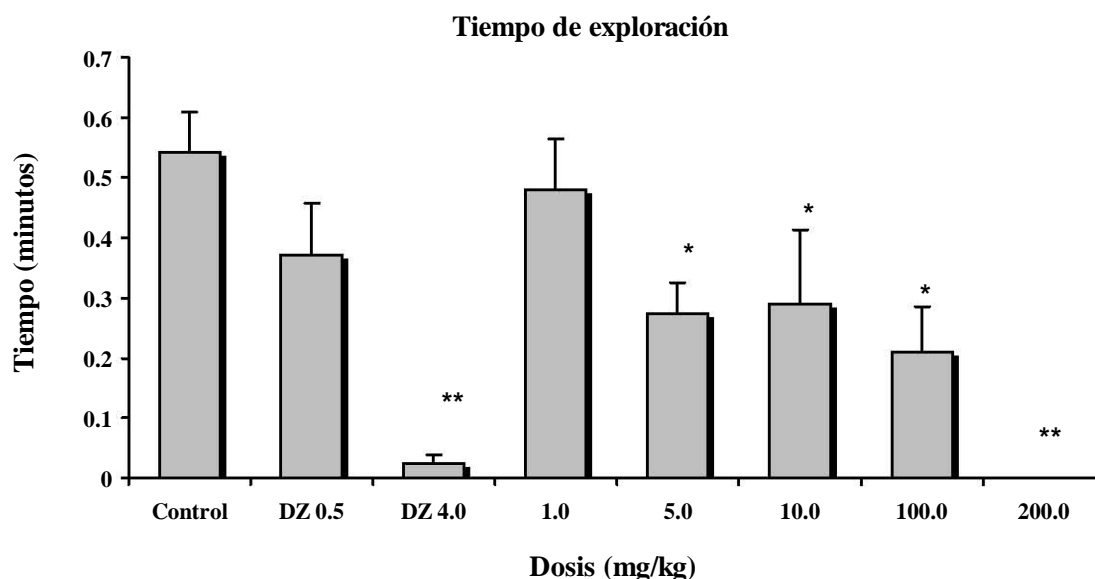


Figura 16. Efecto del extracto acuoso de *D. moldavica* L. en el tiempo de exploración del modelo tablero con perforaciones o "Hole-Board". Prueba de U de Mann-Whitney * $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.001$.

En la figura 16 se observa que al aumentar la dosis del extracto, el tiempo de exploración disminuye en comparación con los animales a los que se les administró SSI y DZ 0.5 mg/kg. Al igual que en la gráfica anterior, se corrobora que a dosis altas del extracto se produce un comportamiento similar al de DZ 4.0 mg/kg dosis en la que esta BDZ ejerce un efecto sedante.

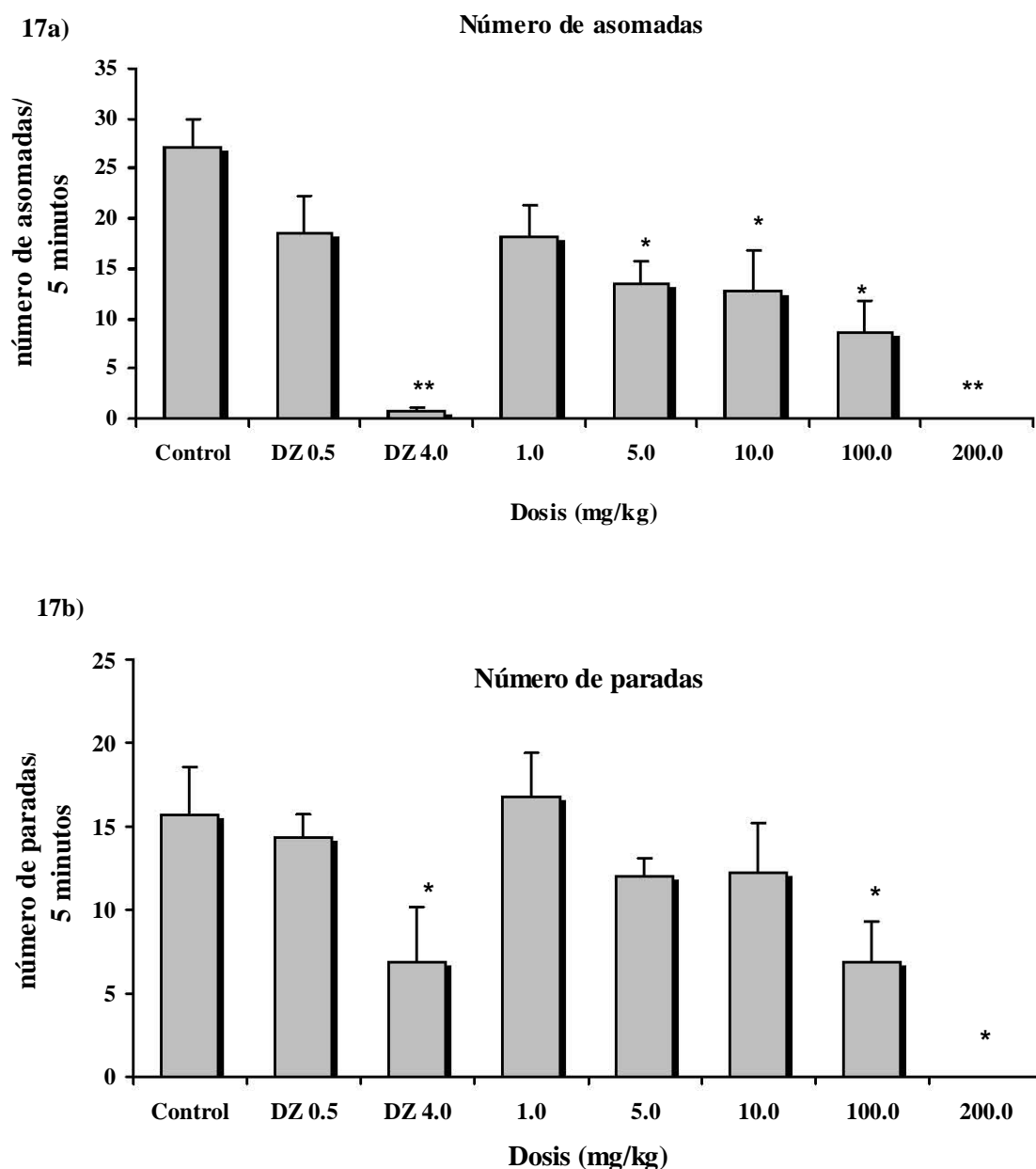


Figura 17. Efecto del extracto acuoso de *D. moldavica* L. en 17a y 17b el número de asomadas y número de paradas respectivamente del modelo tablero con perforaciones o “Hole-Board”. Prueba de U de Mann-Whitney * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$.

En la figura 17 se observa que la actividad exploratoria de los animales determinada en este modelo por el número de asomadas y número de paradas, disminuye al aumentar la dosis del extracto, este comportamiento es similar al de DZ 4.0 mg/kg.

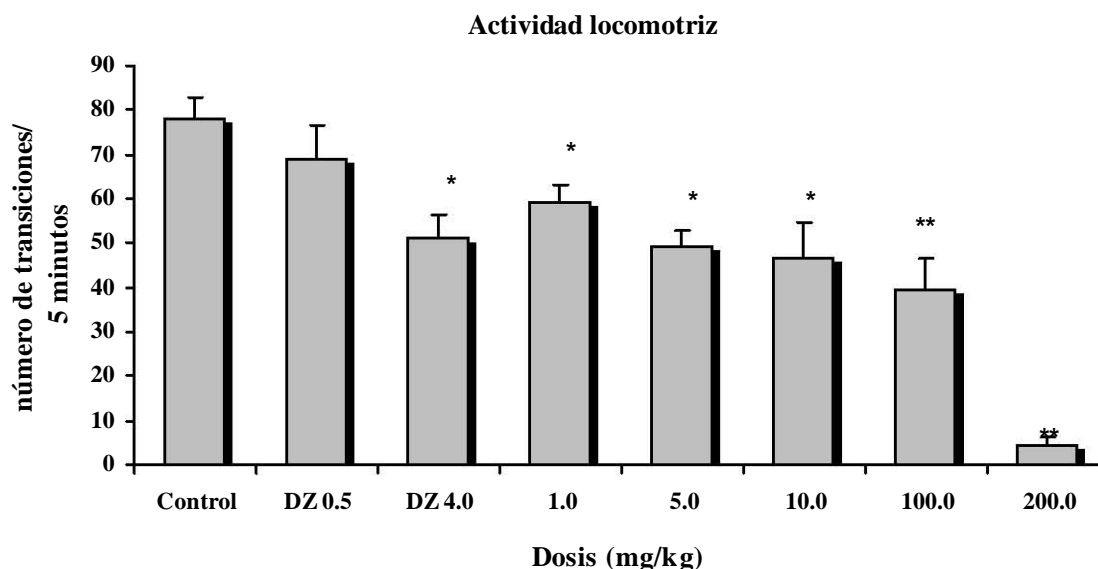


Figura 18. Efecto del extracto acuoso de *D. moldavica* L. en la actividad locomotriz del modelo tablero con perforaciones o “Hole-Board”. Prueba de U de Mann-Whitney * $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.001$.

Por último, con respecto al modelo conductual del tablero con perforaciones o “Hole-Board”, en la figura 18 se observa que los grupos de animales a los que se les administró el extracto disminuye de manera dosis dependiente su actividad locomotriz con respecto al control SSI y DZ 0.5 mg/kg, este efecto es similar al observado a dosis sedantes de DZ.

La disminución significativa dosis dependiente en las variables tiempo de exploración, NP y NA, indican que el extracto produce un efecto sedante a las dosis de 100.0 y 200.0 mg/kg. El aumento en el tiempo de latencia de la primera exploración y la disminución de la actividad locomotriz a las dosis mencionadas anteriormente, confirman que en este modelo el extracto produce un efecto sedante. Mientras que a dosis menores el extracto probablemente no tiene un efecto específico.

En la tabla número 4 se muestran todos los resultados obtenidos en el modelo tablero con perforaciones.

Tabla 4. Resultados obtenidos en el modelo tablero con perforaciones o “Hole-Board” por vía de administración ip.

Dosis (mg/kg.)	Latencia de exploración (minutos)	Tiempo de exploración (minutos)	Número de asomadas (número de asomadas/5 min.)	Número de paradas (número de paradas/5 min.)	Actividad locomotriz (número de transiciones/5 min.)
SSI	0.50±0.07	0.54±0.07	27.14±4.49	15.71±2.83	78.00±4.84
1.0	0.68±0.15	0.48±0.08	18.20±3.23	16.80±2.93	58.90±4.12*
5.0	0.65±0.12	0.28±0.05*	13.40±2.40*	12.000±1.25	49.30±3.60*
10.0	0.48±0.12	0.29±0.12*	12.75±4.17*	12.250±3.02	46.63±7.910*
100.0	0.28±0.091	0.21±0.07*	8.63±3.07*	6.88±2.45*	39.25±7.35**
200.0	>5.0**	0.00±0.0**	0.00±0.00**	0.00±0.00**	4.5±1.66**

Los resultados se expresan como el promedio ± error estándar medio, n = 8-10 animales por dosis. p*≤0.05, p**≤0.001 vs control SSI.

Los efectos del extracto acuoso de *D. moldavica* L. sobre la coordinación motriz se evaluó en la prueba del rodillo giratorio o "Rota-Rod". En la figura 19, se observa un aumento en el número de caídas cuando los sujetos experimentales fueron administrado con dosis altas del extracto (100.0 y 200.0 mg/kg), lo cual indica la pérdida de la coordinación motriz por relajación muscular producida por los efectos sedantes del extracto.

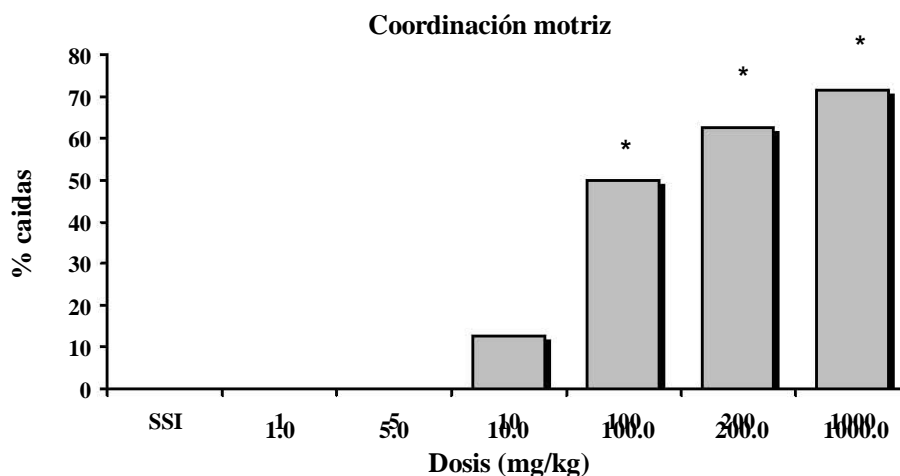


Figura 19. Coordinación motriz en la prueba del rodillo giratorio o “Rota-Rod”. Prueba de Fisher *p=0.029, *p=0.009 y *p=0.005 a la dosis de 100, 200 y 1000 mg/kg respectivamente.

El efecto sedante producido por dosis altas del extracto observado en el modelo tablero con perforaciones o “Hole-Board”, se confirmó en el modelo de potenciación de sueño con Pentobarbital sódico (PB). En la figura 20, se observa que a la dosis de 42.0 mg/kg de PB, se produjo un aumento significativo en el tiempo de sueño a 200.0 mg/kg de extracto con respecto al control de SSI. Mientras que a la dosis de 30.0 mg/kg de PB, dosis que no es suficiente para inducir sueño por sí sólo, se observa nuevamente a dosis altas del extracto un aumento estadísticamente significativo en el tiempo de sueño.

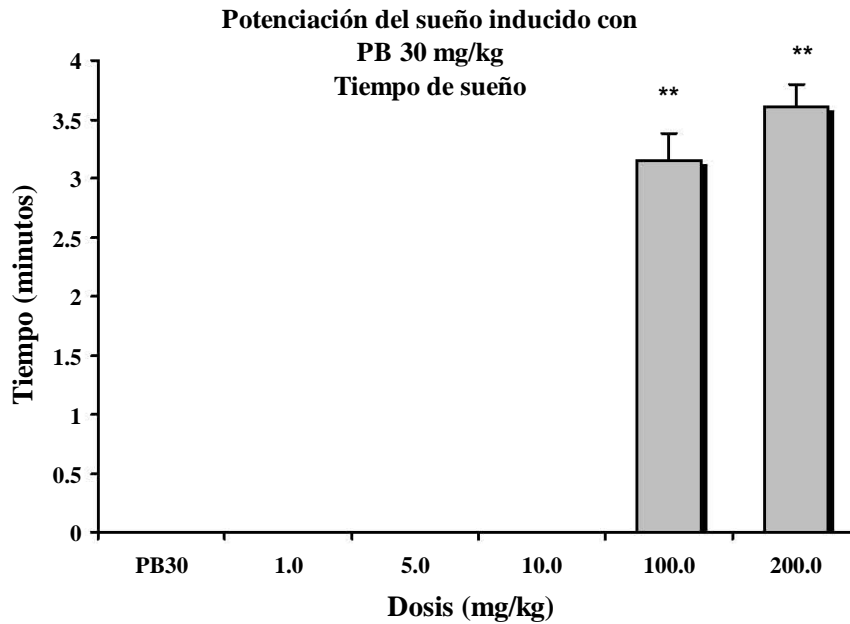
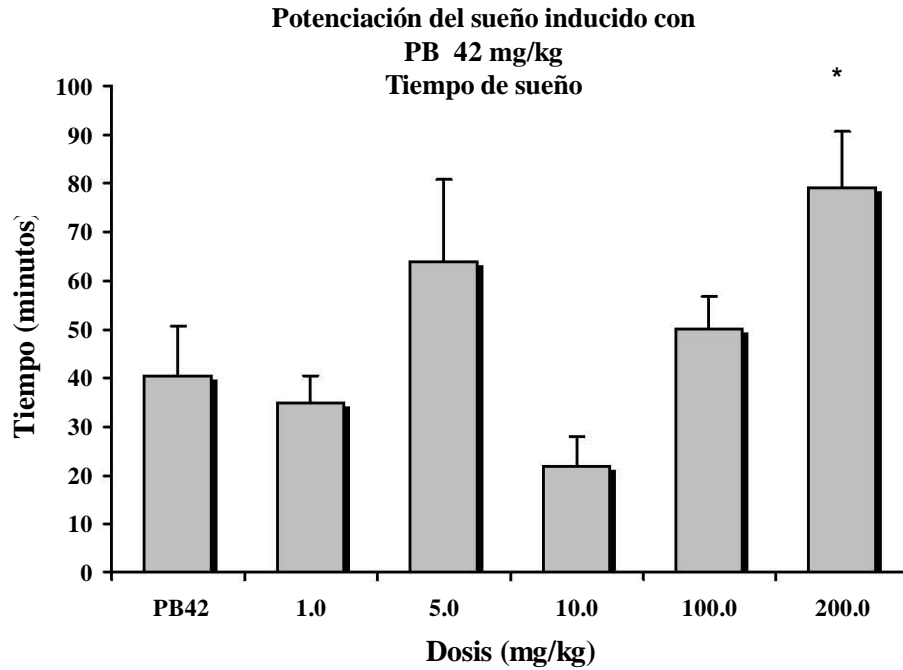


Figura 20. Efecto del extracto acuoso de *D. moldavica* L. en el tiempo de sueño de la prueba de potenciación de sueño inducido con Pentobarbital sódico. Prueba de U de Mann-Whitney * $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.001$.

En cuanto a la actividad antiepiléptica del extracto acuoso de *D. moldavica* L., en el modelo de actividad convulsiva inducida con PTZ no se observó efecto anticonvulsivo a ninguna de

las dosis probadas, probablemente es necesario administrar dosis mayores del extracto o administrar una dosis menor de PTZ para determinar los efectos del extracto en los diferentes status de las crisis.

Con respecto al estudio fitoquímico, se tiene que de las fracciones eluidas con Hexano/AcOEt 6:4 se aisló a través de posteriores procesos cromatográficos un compuesto de color amarillento que se identificó como **acacetina (5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona)**, cabe mencionar que este metabolito secundario es considerado como un marcador químico taxonómico de la familia Lameaceae.

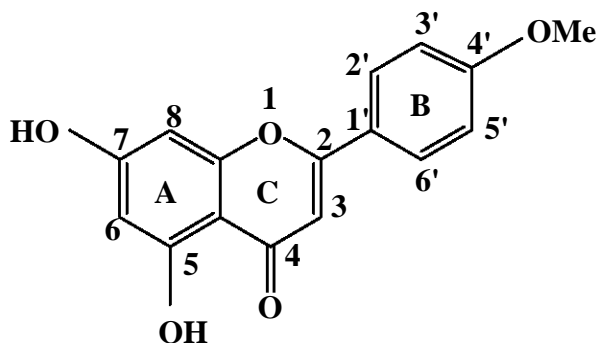


Figura 21. Acacetina.

En el espectro de masas obtenido por impacto electrónico se observa el ion molecular a m/z 284 corresponde a la fórmula $C_{16}H_{12}O_5$ (Espectro 1). También se observan dos señales a m/z 132 y 152 que corresponden a los fragmentos C_9H_8O y $C_7H_4O_4$ respectivamente producidos por una fragmentación de tipo retro Diels-Alder. Además, con este espectro se confirma la presencia del grupo metoxilo en el anillo B.

En el espectro de RMN 1H (Espectro 2) se observan a 12.79 y 10.24 ppm las señales del grupo hidróxilo unido a un grupo aromático, cada señal aparece como singulete ancho e integra para un protón. La señal de 12.79 ppm se asigna al OH del carbono C-5, este protón se encuentra quelatado, es decir, es un protón que interacciona electrostáticamente con el átomo de oxígeno del grupo carbonilo, lo que causa una disminución de densidad electrónica en el entorno del protón del hidróxilo, originando entonces un efecto de desprotección sobre el mismo, desplazando la señal hacia campo más bajo. La señal a 10.24 ppm se asigna al protón del grupo hidróxilo del carbono C-7.

Adicionalmente, se observan un par de señales simétricas a 7.85 y 7.02 ppm cada una de ellas integra para dos protones y corresponde a la sustitución 1, 4 en el anillo B. Este patrón de señales se identifica como un sistema de acoplamiento AA'BB' y se asigna a los protones H-2', H-6' y H-3', H-5' respectivamente. La sustitución del grupo metoxilo en el carbono C-4' ejerce un efecto de protección sobre los protones H-3' y H-5' provocando que el desplazamiento químico de estos protones se observe hacia campo alto. La señal a 3.89 ppm se asigna a los protones del grupo metoxilo unido al carbono C-4', esta señal aparece como singulete e integra para tres protones. El desplazamiento de los protones del metilo hacia campo bajo se debe al efecto de desprotección que ejerce el átomo de oxígeno al ser un átomo más electronegativo. También se observa a 6.54 ppm un singulete que integra para un protón, esta señal se asigna al protón H-3 y corresponde al protón vinílico que se encuentra adyacente al grupo carbonilo del anillo C.

Finalmente, en 6.44 y 6.26 ppm se presentan dos señales dobles en donde cada una de ellas integra para un protón. Este patrón de señales se identifica como un sistema de acoplamiento AB, en donde la constante de acoplamiento entre estos protones es de 2.1 Hz, valor característico para una constante de acoplamiento *meta*. La presencia en el anillo A de los grupos hidróxilo en posición *orto* produce un efecto de protección, por lo que el desplazamiento químico de ambas señales aparece hacia campo alto. La señal a 6.44 ppm se asigna al H-8 del anillo A, su ligero desplazamiento químico a campo bajo con respecto a la señal de 6.26 ppm asignada al H-6 del mismo anillo, se explica por un menor efecto de protección de los grupos hidróxilo y OR en posición *orto*, en comparación al mayor efecto de protección de los dos grupos hidróxilo sobre la señal asignada a H-6.

En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 4) se observan 14 señales. En la zona de campo bajo a 181.57 ppm se tiene una señal que es característica de un carbono de carbonilo de cetona conjugada, señal asignada al átomo de carbono C-4. Adicionalmente, se observan las señales de los diferentes tipos de átomos de carbono aromáticos sp^2 que conforman los anillos del esqueleto principal (anillos A y B). En 161.41, 161.89, 163.08, 163.78 y 157.18 ppm se observan las señales de C-2, C-5, C-9, C-7 y C-4' respectivamente, todas estas señales corresponden a los átomos de carbono aromático unidos a oxígeno. Estos átomos de

carbono por estar unidos a un átomo de oxígeno se encuentran a campo bajo debido a la desprotección que sufren por efecto inductivo. Las señales para los átomos de carbono sp^2 no protonados aparecen en 122.86 ppm para el C-1' y 103.88 ppm para el C-10, esta última señal se encuentra a campo alto con respecto a la anterior debido a la protección que generan los átomos de oxígeno en posición *orto*. Por otra parte, a campo alto se observan las señales de los átomos de carbono sp^2 protonados en 103.29 ppm para el C-3, en 98.82 ppm para el C-6 y en 93.61 ppm para el C-8, así como los carbonos equivalentes en 127.41 ppm para C-2' y C-6' y en 113.90 ppm para C-3' y C-5'. Por último, en la región de carbonos sp^3 aparece una señal en 54.94 ppm que se asigna al átomo de carbono del grupo metoxilo.

De las primeras fracciones eluidas con AcOEt y posteriores procesos cromatográficos se aisló un compuesto de color blanco verdoso que se identificó como **apigenina (5, 7, 4'-trihidroxi flavona)**.

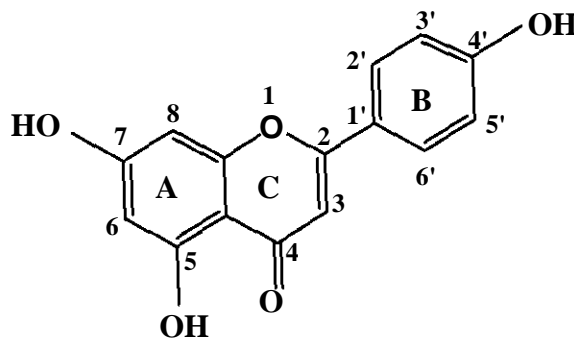


Figura 22. Apigenina.

En el espectro de masas obtenido por FAB⁺ se observa un ion molecular M⁺ +1 a m/z 271, que corresponde a una fórmula C₁₅H₁₀O₅. (Espectro 6).

En el espectro de RMN ¹H (Espectro 7) se observan en 12.88, 10.16 y 9.74 ppm tres señales singulete anchas, en donde cada una integra para un protón. Por el desplazamiento químico a campo bajo, la multiplicidad y la integral se determina que son protones de grupos hidróxilo unido un grupo aromático. La señal de 12.88 ppm se asigna al protón del

OH unido a C-5, este protón se encuentra quelatado, es decir que interacciona electrostáticamente con el oxígeno del grupo carbonilo, lo que origina un efecto de desprotección sobre este protón y que provoca que el desplazamiento químico del mismo se encuentre a campo más bajo con respecto a los otros dos. Las señales en 10.16 ppm y a 9.74 ppm corresponden a protones de los grupos OH unidos a anillo aromático, y se asignan a los protones de OH unidos a C-7 y C-4' respectivamente.

También, se observa un par de señales simétricas en 7.76 y 6.95 ppm, donde cada una de ellas integra para dos protones y corresponde a una sustitución aromática 1, 4 del anillo B. Este patrón de señales se identifica como un sistema de acoplamiento AA'BB' y se asigna a los protones H-2', H-6' y H-3', H-5' respectivamente. La presencia del grupo hidróxilo en el carbono C-4' genera un efecto de protección sobre los protones H-3' y H-5', lo que explica su desplazamiento a campo alto (6.95 ppm).

Adicionalmente al sistema AA'BB', se observa en 6.50 ppm un singulete que integra para un protón y se asigna al protón H-3, señal que corresponde al protón vinílico en posición α al grupo carbonilo del anillo C.

Al igual que el compuesto anterior, se observa en 6.43 y 6.26 ppm el sistema de acoplamiento AB. La constante de acoplamiento es de 2.1 Hz, valor característico para una constante de acoplamiento *meta*. La presencia en el anillo A de los átomos de oxígeno del grupo hidróxilo en posición *orto*, produce por efectos de protección que el desplazamiento de ambas señales se observe hacia campo alto. Es así como la señal a 6.43 ppm se asigna al H-8 del anillo A, en donde su ligero desplazamiento a campo bajo con respecto a la señal de 6.26 ppm asignada al H-6 del mismo anillo, se debe al menor efecto de protección que ejercen los grupos hidróxilo y OR en posición *orto*, en comparación con los dos átomos de oxígeno de los grupo hidróxilo en posición *orto* que protegen más al protón H-6.

En el espectro de RMN ^{13}C (Espectros 9 y 10) se observan 13 señales. En la zona de campo bajo a 181.66 ppm se tiene una señal que es característica de un carbono de carbonilo de cetona conjugada, señal asignada al átomo de carbono C-4. Las señales restantes

corresponden a los diferentes tipos de átomos de carbono aromáticos sp^2 de los anillos A y B. En 160.59, 160.80, 161.42, 164.07 y 152.26 ppm se observan las señales de C-2, C-5, C-9, C-7 y C-4' respectivamente, todas estas señales corresponden a los átomos de carbono aromático unido a oxígeno. Estos átomos de carbono por estar unidos a un átomo de oxígeno se encuentran a campo bajo debido a la desprotección que sufren por efecto inductivo. También, se observan las señales de los átomos de carbono sp^2 no protonados en 127.55 ppm para el C-1' y 102.70 ppm para el C-10, esta última señal se encuentra a campo alto con respecto a la anterior debido a la protección que generan los átomos de oxígeno en posición *orto*. Finalmente, a campo alto se tienen las señales de los átomos de carbono sp^2 unidos a hidrógeno en 121.39 ppm para el C-3, en 98.76 ppm para el C-6 y 93.58 ppm para el C-8, así como los carbonos equivalentes en 127.48 ppm para C-2' y C-6' y en 115.60 ppm para C-3' y C-5'.

De las fracciones eluidas con AcOEt/MeOH 9:1, se obtuvo un sólido amarillo que se identificó por sus propiedades espectroscópicas como la mezcla de tres compuestos, de los cuales dos son de posible naturaleza flavonoide.

En el espectro de masas obtenido por FAB⁺ (Espectro 12) se obtiene un ion molecular M⁺+1 a m/z 447, que corresponde a una fórmula C₂₂H₂₂O₁₀. Además en el espectro de RMN ¹H (Espectro 13, 14 y 15) se observan las señales que corresponden a la **7-O-glucosil acetina**. Este metabolito secundario se logró aislar puro a partir del precipitado obtenido del extracto metanólico por cromatografía en fase reversa.

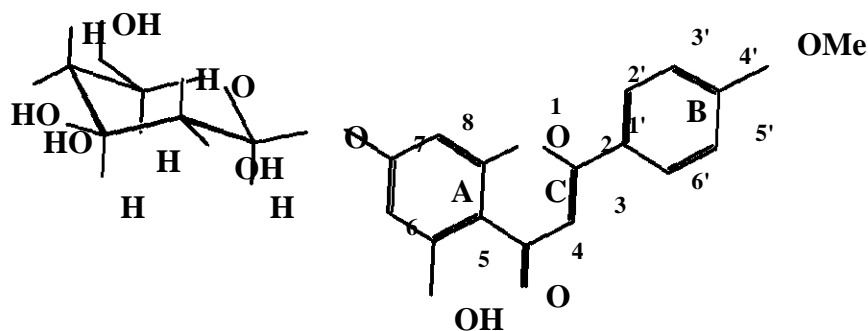


Figura 23. 7-O-glucosil acetina.

En el espectro de RMN ^1H (Espectro 13) se observa en 13.3 ppm un singlete que integra para un protón y que se asigna al protón de OH unido al carbono C-5, este protón se encuentra quelatado, lo cual origina por efectos de desprotección su desplazamiento a campo bajo. Cabe mencionar que esta señal es característica de algunos compuestos de tipo flavonoide.

Adicionalmente, las señales en 8.07 y 7.14 ppm se identifican como un sistema de acoplamiento AA'BB' y se asigna a los protones H-2', H-6' y H-3', H-5' respectivamente. Cada una de ellas integra para dos protones y corresponde a una sustitución aromática 1, 4 del anillo B. La presencia del grupo metoxilo en el carbono C-4' genera un efecto de protección sobre los protones H-3' y H-5', lo que explica su desplazamiento a campo alto (7.14 ppm).

La señal en 6.96 ppm se observa como un singlete que integra para un protón y se asigna al protón H-3, señal que corresponde al protón vinílico en posición α al grupo carbonilo del anillo C.

Las señales en 5.40, 5.07, 4.62 y de 3.74-3.21 ppm corresponden a las señales del anillo de glucosa. La señal en 5.07 ppm se observa como un doblete e integra para un protón, esta señal se asigna al protón del carbono anomérico; en 5.40 y 4.62 aparecen señales anchas que corresponden a los protones de los grupos hidróxilo de la glucosa, estas señales se intercambian con D_2O (Espectro 15), y de 3.74-3.21 ppm se observa un conjunto de señales que se asigna a los protones unidos a los átomos de carbono de la glucosa.

Por otra parte, en 6.86 y 6.46 ppm se presentan dos señales dobles en donde cada una de ellas integra para un protón, este patrón de señales se identifica como un sistema de acoplamiento AB. La constante de acoplamiento entre estos protones es de 1.8 Hz, que corresponde a una constante de acoplamiento *meta*. La presencia en el anillo A del átomo de oxígeno del grupo hidróxilo y la glucosa en posición *orto*, produce por efectos de protección que el desplazamiento de ambas señales se observe hacia campo alto. Es así como la señal a 6.86 ppm se asigna al H-8 del anillo A, en donde su ligero desplazamiento

a campo bajo con respecto a la señal de 6.46 ppm asignada al H-6 del mismo anillo, se debe al menor efecto de protección que ejerce el grupo hidróxilo y el grupo O-C=C en posición *orto*, en comparación con el átomo de oxígeno del grupo hidróxilo y la O-glucosa.

A continuación se muestran los datos RMN de los metabolitos secundarios de tipo flavonoide aislados:

Tabla 5. Señales de RMN ¹H para acetina.

Asignación	Desplazamiento químico δ (ppm)	Integración	Multiplicidad	Constante de acoplamiento J(Hz)
H-3	6.54	1H	s	
7-OH	10.24	1H	s	
H-6	6.26	1H	d	2.1
5-OH	12.79	1H	s	
H-8	6.44	1H	d	2.1
H-2', H-6'	7.85	2H	Sistema AA'BB'	
H-3', H-5'	7.02	2H	Sistema AA'BB'	
4'-OCH ₃	3.89	3	s	

Tabla 6. Señales de RMN ¹³C para acetina.

Asignación	Desplazamiento químico δ (ppm)	DEPT
C-2	161.41*	
C-3	103.29*	CH
C-4	181.57	
C-5	161.89*	
C-6	98.82	CH
C-7	163.78*	
C-8	93.61	CH
C-9	163.08*	
C-10	103.88*	
C-1'	122.86	
C-2', C-6'	127.41	CH
C-3', C-5'	113.90	CH
C-4'	157.18	
4'-OCH ₃	54.94	CH ₃

*Señales intercambiables.

Tabla 7. Señales de RMN ¹H para apigenina.

Asignación	Desplazamiento químico δ (ppm)	Integración	Multiplicidad	Constante de acoplamiento J(Hz)
H-3	6.50	1H	s	
5-OH	12.88	1H	s	
H-6	6.26	1H	d	2.1
7-OH	10.16	1H	s	
H-8	6.43	1H	d	2.1
H-2', H-6'	7.76	2H	Sistema AA'BB'	
H-3', H-5'	6.95	2H	Sistema AA'BB'	
4'-OH	9.74	1H	s	

Tabla 8. Señales de RMN ¹³C para apigenina.

Asignación	Desplazamiento químico δ (ppm)	DEPT
C-2	160.59*	
C-3	121.39	CH
C-4	181.66	
C-5	160.80*	
C-6	98.76	CH
C-9	161.42	
C-8	93.58	CH
C-7	164.07	
C-10	102.70	
C-1'	127.55*	
C-2', C-6'	127.48*	CH
C-3', C-5'	115.60	CH
C-4'	152.26	

* Señales intercambiables.

Tabla 9. Señales de RMN ¹H para 7-O-glucosil acacetina.

Asignación	Desplazamiento químico δ (ppm)	Integración	Multiplicidad	Constante de acoplamiento J(Hz)
H-3	6.96	1H	s	
5-OH	13.3	1H	s	
H-6	6.46	1H	d	1.8
H-8	6.86	1H	d	1.8
H-2 glucosa	5.07	1H	d	
OH glucosa	4.62	1H	s	
OH glucosa	5.07	1H	s	
OH glucosa	5.40	1H	s	
protones del anillo de glucosa	3.74-3.21		varias señales	
			Sistema	
H-2', H-6'	8.07	2H	AA'BB'	
			Sistema	
H-3', H-5'	7.14	2H	AA'BB'	
4'-OCH ₃	3.87	3H	s	

Además de los metabolitos secundarios de tipo flavonoide se aislaron cinco compuestos de tipo terpenoide: β -sitosterol, ácido ursólico, 3-O-glucosil- β -sitosterol o daucosterol y la mezcla de ácido corosólico y ácido maslínico, los cuales fueron identificados mediante comparación con una muestra auténtica.

De los compuestos aislados de *D. moldavica* L. cabe mencionar que es la primera vez que se describe la presencia de daucosterol en una especie del género *Dracocephalum*.

El efecto sedante del extracto acuoso de *D. moldavica* L. probablemente es producido por acacetina, apigenina, 7-O-glucosil acacetina o algún otro metabolito secundario de tipo flavonoide que no se logro identificar en el estudio fitoquímico de los extractos orgánicos. Esto se plantea, porque se ha descrito que algunos flavonoides poseen actividad sobre el SNC y en un estudio paralelo realizado por nuestro grupo de trabajo se identificó a partir del mismo extracto acuoso la presencia de trece metabolitos secundarios de tipo flavonoide

mediante la técnica de CLAR, de los cuales se mencionan a los que se caracterizaron en el estudio. Sin embargo, será necesario realizar más estudios para determinar si estos metabolitos están involucrados en la participación de los efectos producidos sobre el SNC.

7. CONCLUSIONES

Con base a la evaluación farmacológica realizada a partir del extracto acuoso de *Dracocephalum moldavica* L. se determinó que esta especie ejerce un efecto sedante en el modelo del tablero con perforaciones o “Hole-Board”, este efecto se corroboró en la prueba de potenciación de sueño inducido con PB. El extracto acuoso de *Dracocephalum* produce relajación muscular a las dosis a las cuales ejerce su efecto sedante. Sin embargo, no se observó efecto anticonvulsivo a las dosis probadas.

En la evaluación preliminar de toxicidad aguda DL₅₀, los resultados obtenidos mostraron que la dosis necesaria para producir la muerte de al menos un sujeto experimental fue superior a 2000 mg/kg de peso corporal, lo cual indica que el extracto acuoso de *Dracocephalum* no produce efectos tóxicos letales en las condiciones que se establecieron.

El estudio fitoquímico permitió el aislamiento e identificación estructural de 3 metabolitos secundarios de tipo flavonoide: acacetina, apigenina y 7-O-glucosil acacetina. También, se aislaron e identificaron β -sitosterol, los ácidos triterpénicos ursólico, maslínico y corosólico y el glucosido de β -sitosterol o daucosterol, siendo la primera vez que este último metabolito secundario se aísla de una especie del género *Dracocephalum*.

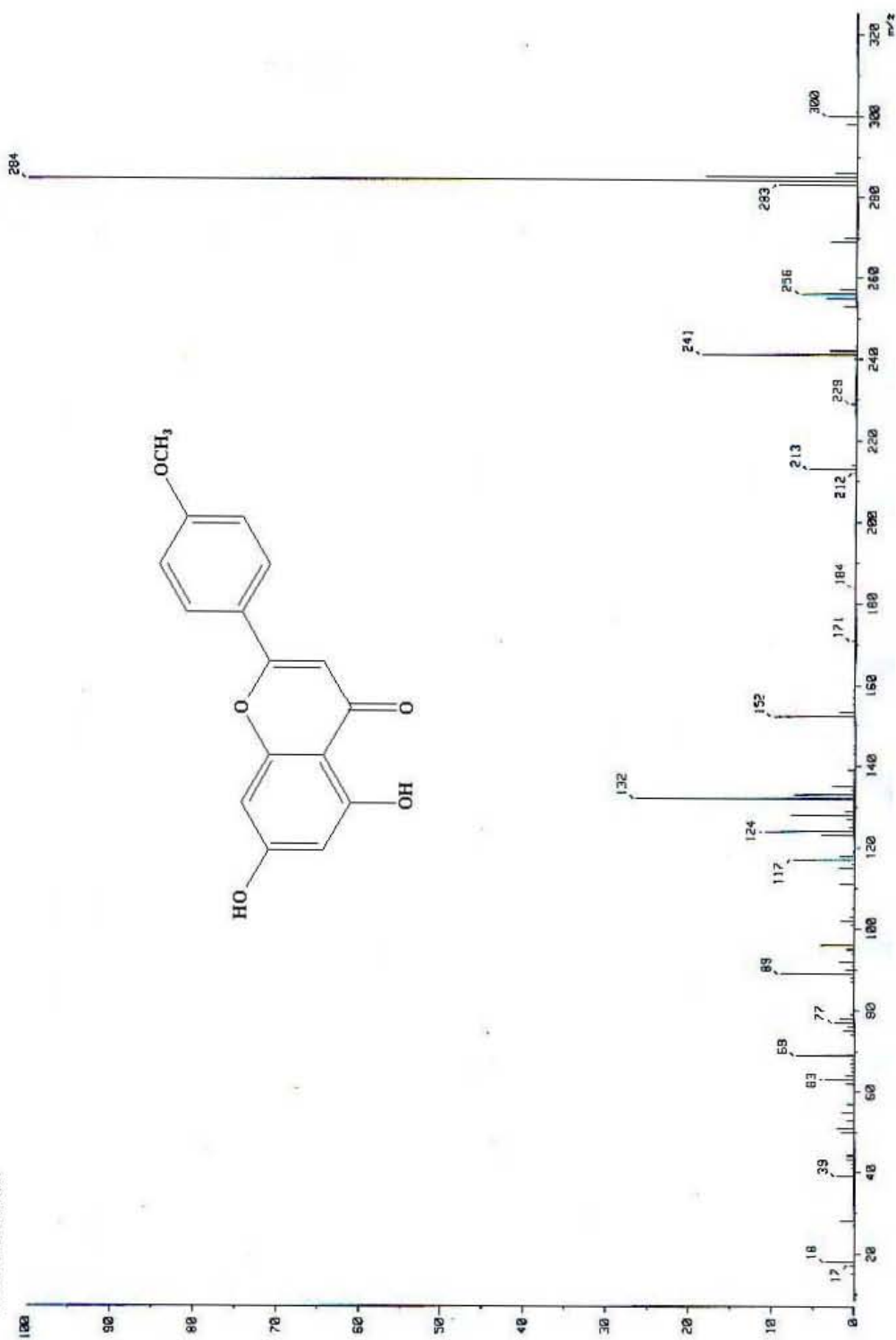
8. PERSPECTIVAS

Con la investigación realizada se abre la posibilidad de evaluar con las mismas pruebas farmacológicas cada uno de los metabolitos secundarios aislados a partir de esta especie y determinar cual o cuales son los posibles principios activos responsables de los efectos producidos por *Dracocephalum moldavica* L.

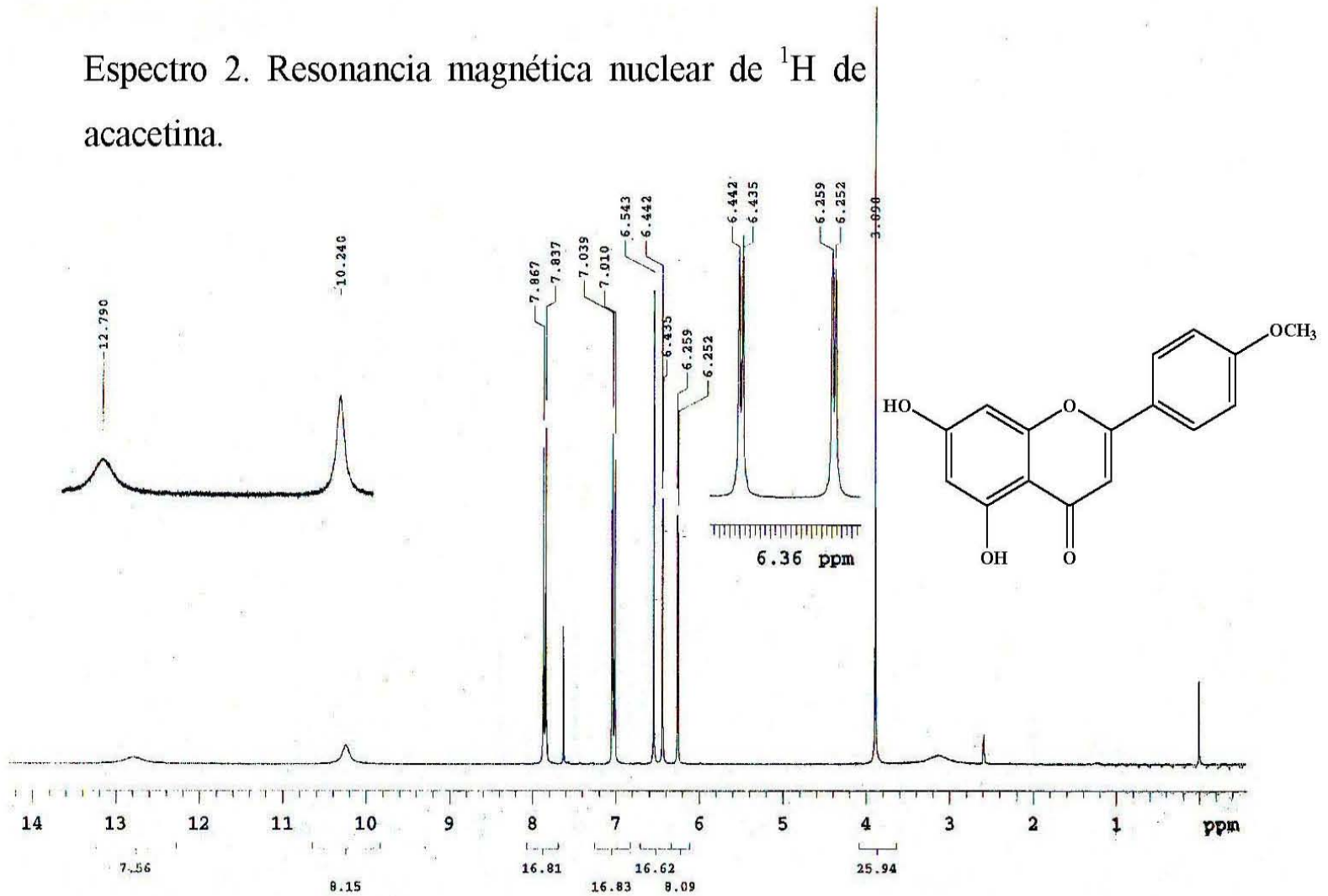
Será posible realizar estudios farmacológicos para poder establecer el sistema neurobiológico al cual está vinculado el mecanismo de acción de estos metabolitos secundarios.

Con este tipo de estudios no solo será posible el descubrimiento de nuevos compuestos activos y el descubrimiento de sus mecanismos de acción, también permitirán establecer que especies pueden ser de utilidad en la terapéutica moderna. Asimismo, se podrá discriminar del mercado las especies que no producen el efecto para lo cual se les recomienda y que en algunos casos hasta pueden ser tóxicas. Se podrá depurar del mercado todas aquellas especies con las que solo se lucra.

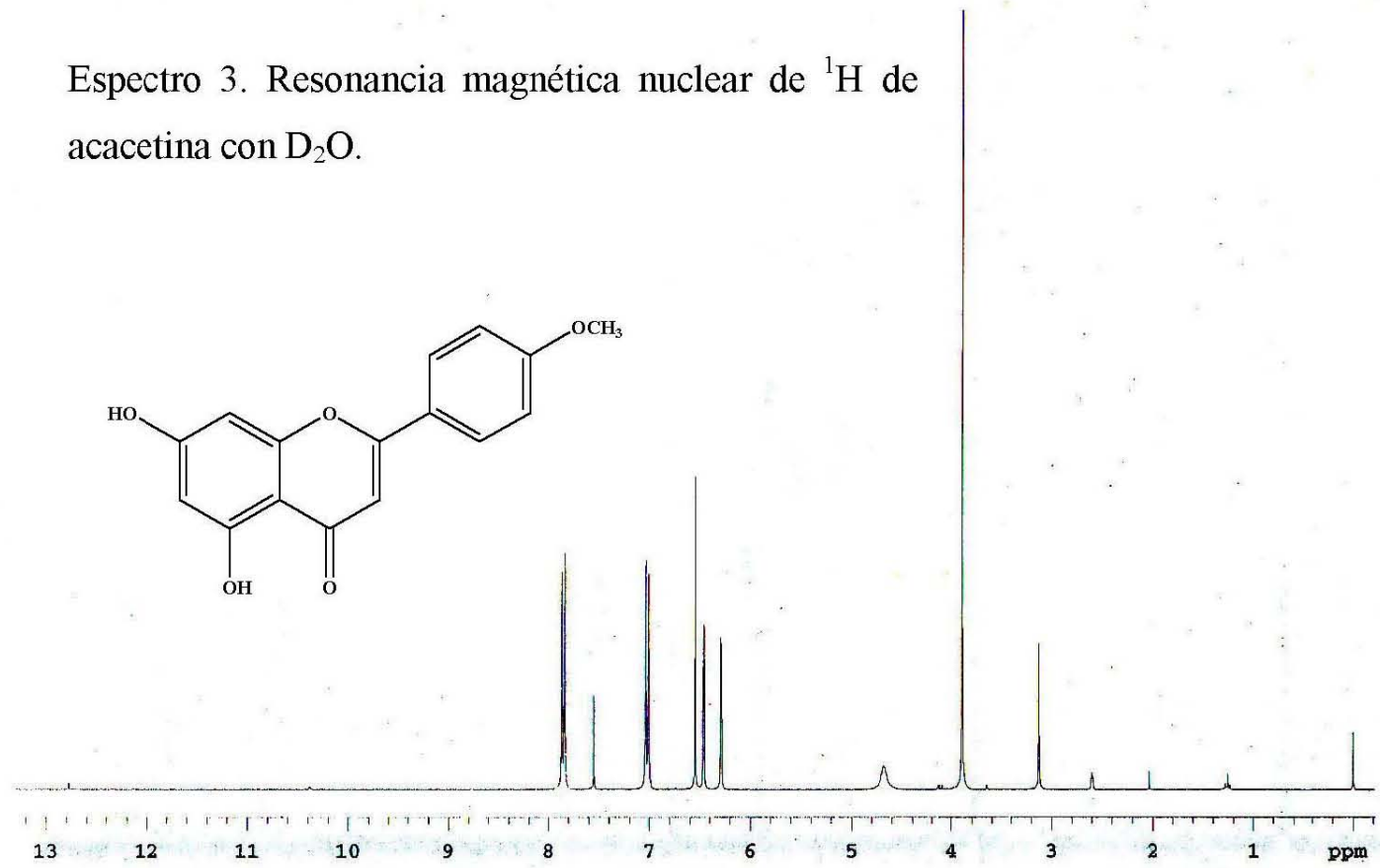
Espectro 1. Espectrometría de masas por IE de acetetina.



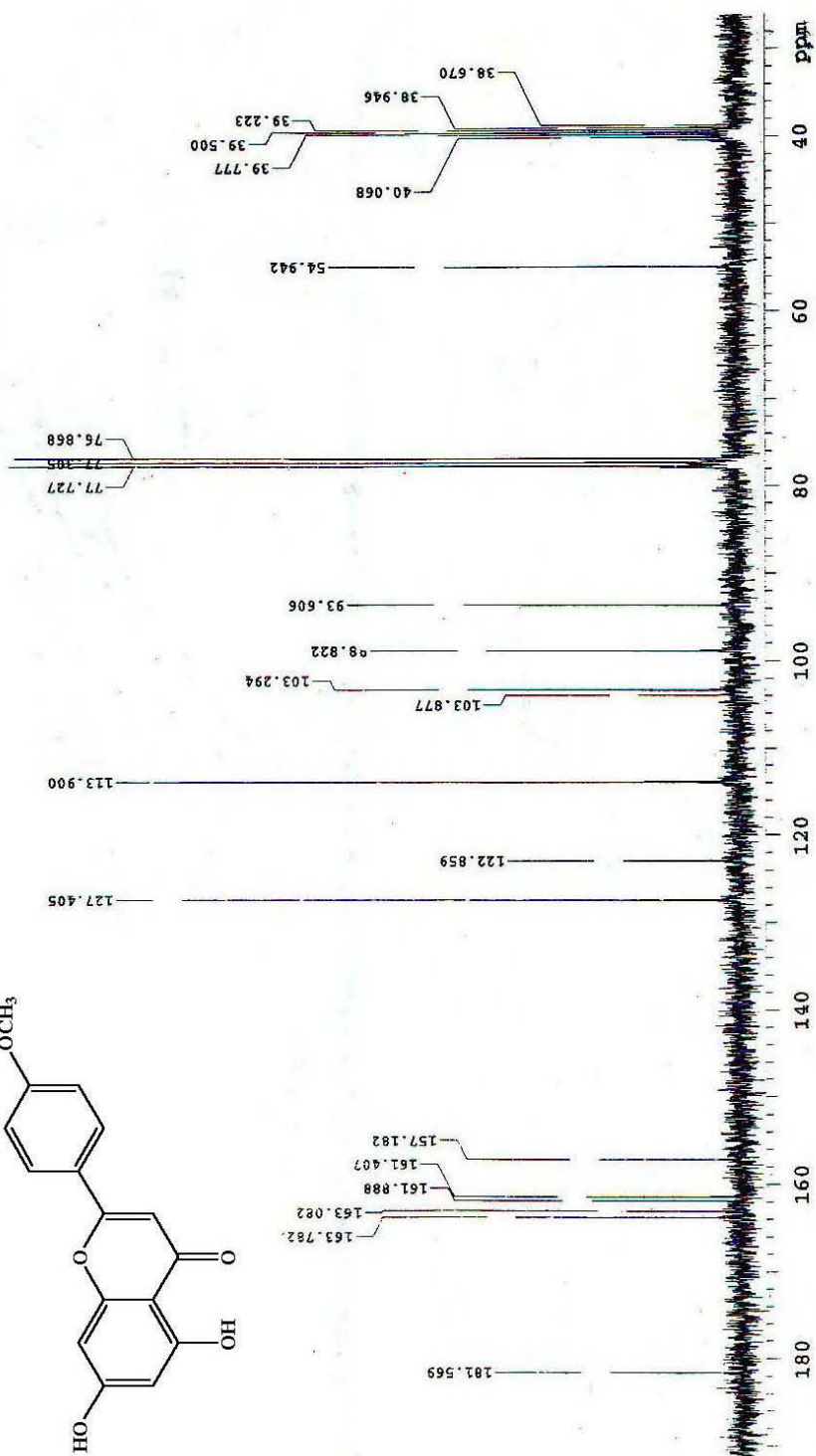
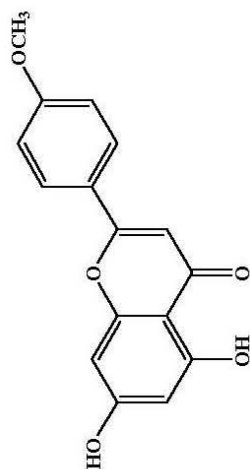
Espectro 2. Resonancia magnética nuclear de ^1H de acetina.



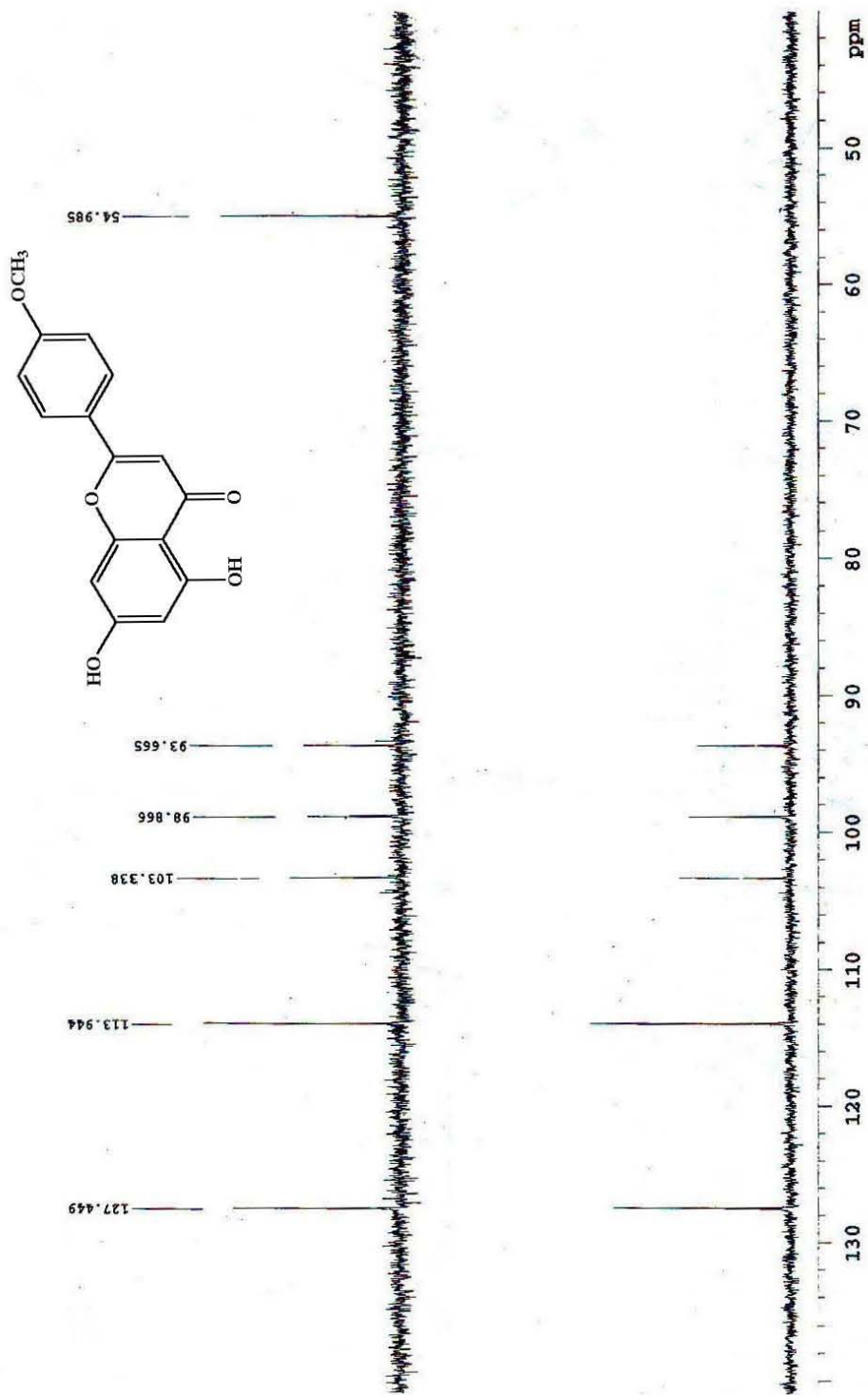
Espectro 3. Resonancia magnética nuclear de ^1H de acetina con D_2O .



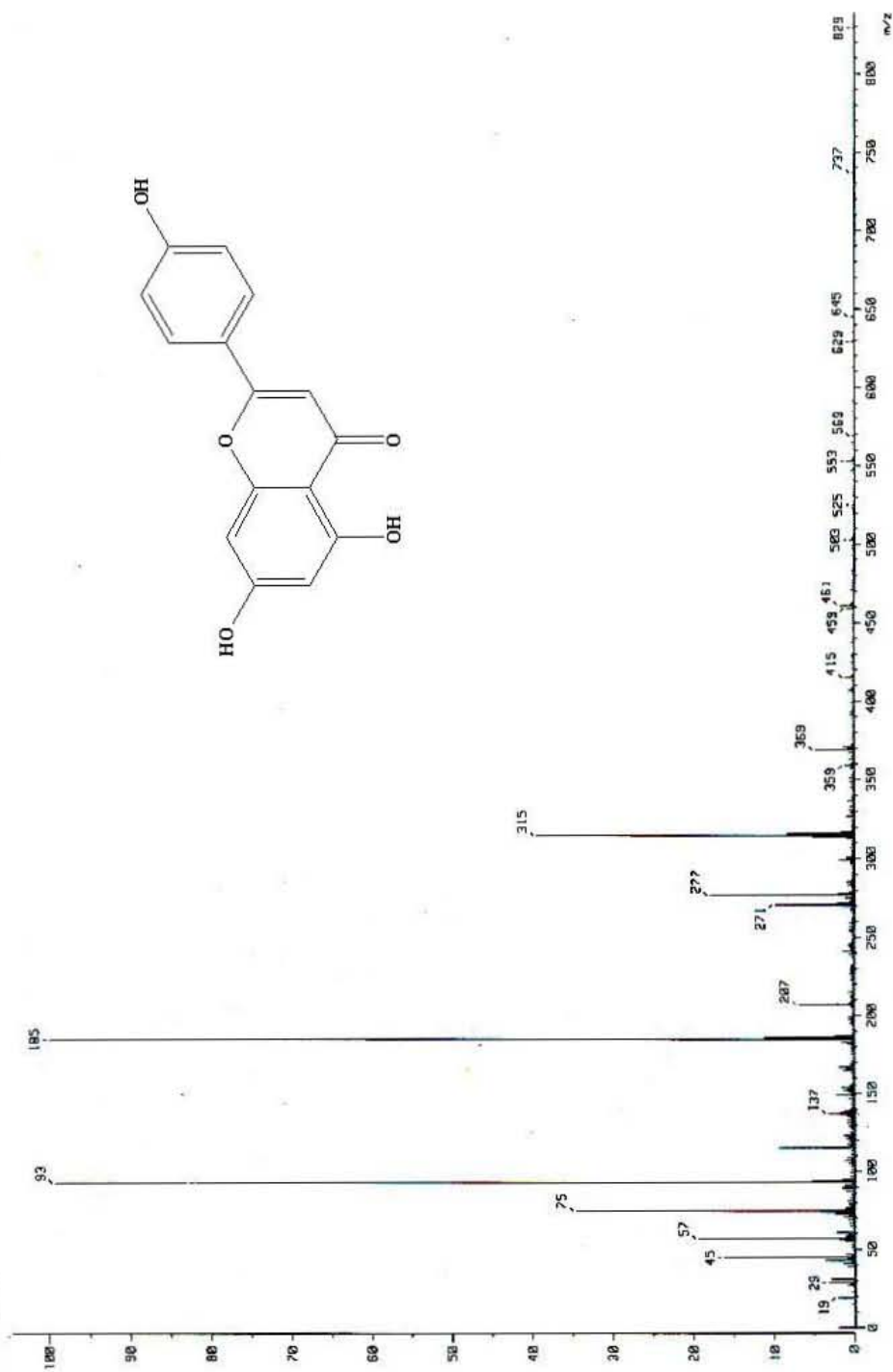
Espectro 4. Resonancia magnética nuclear de ^{13}C de acetetina.



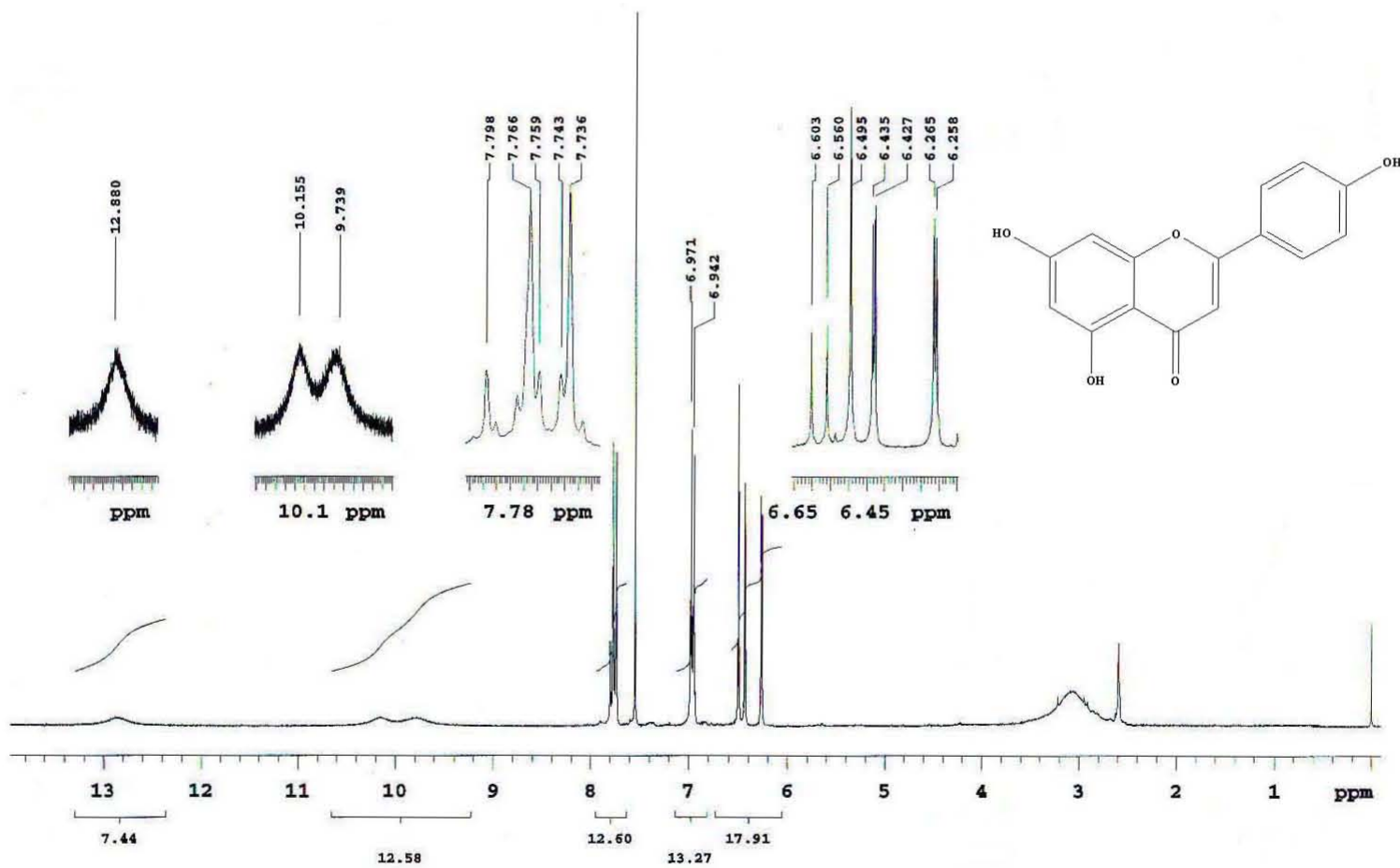
Espectro 5. DEPT de acetina.



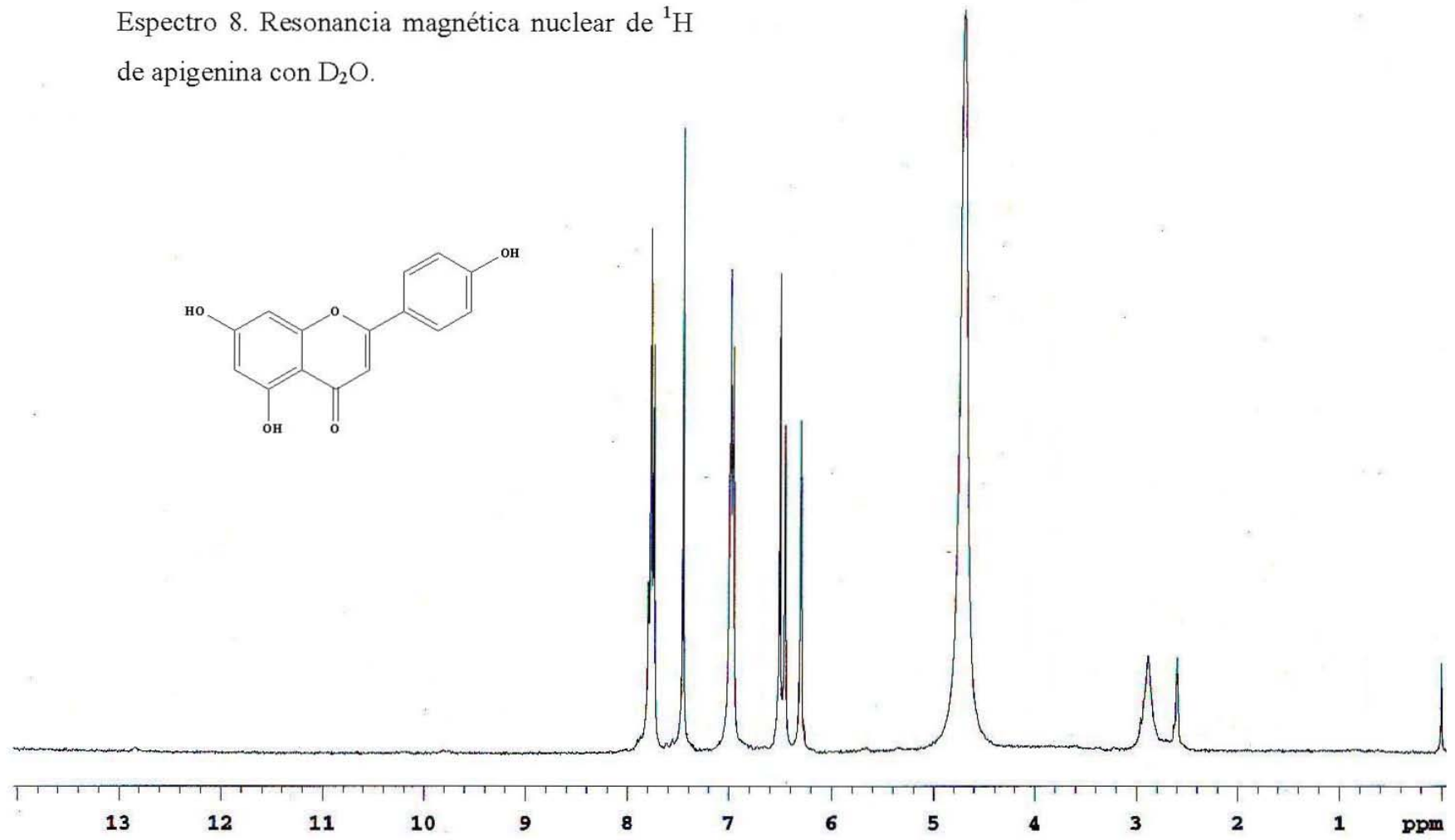
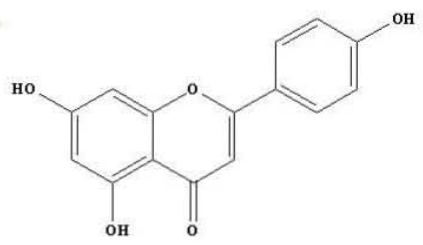
Espectro 6. Espectrometría de masas por FAB⁺ de apigenina.



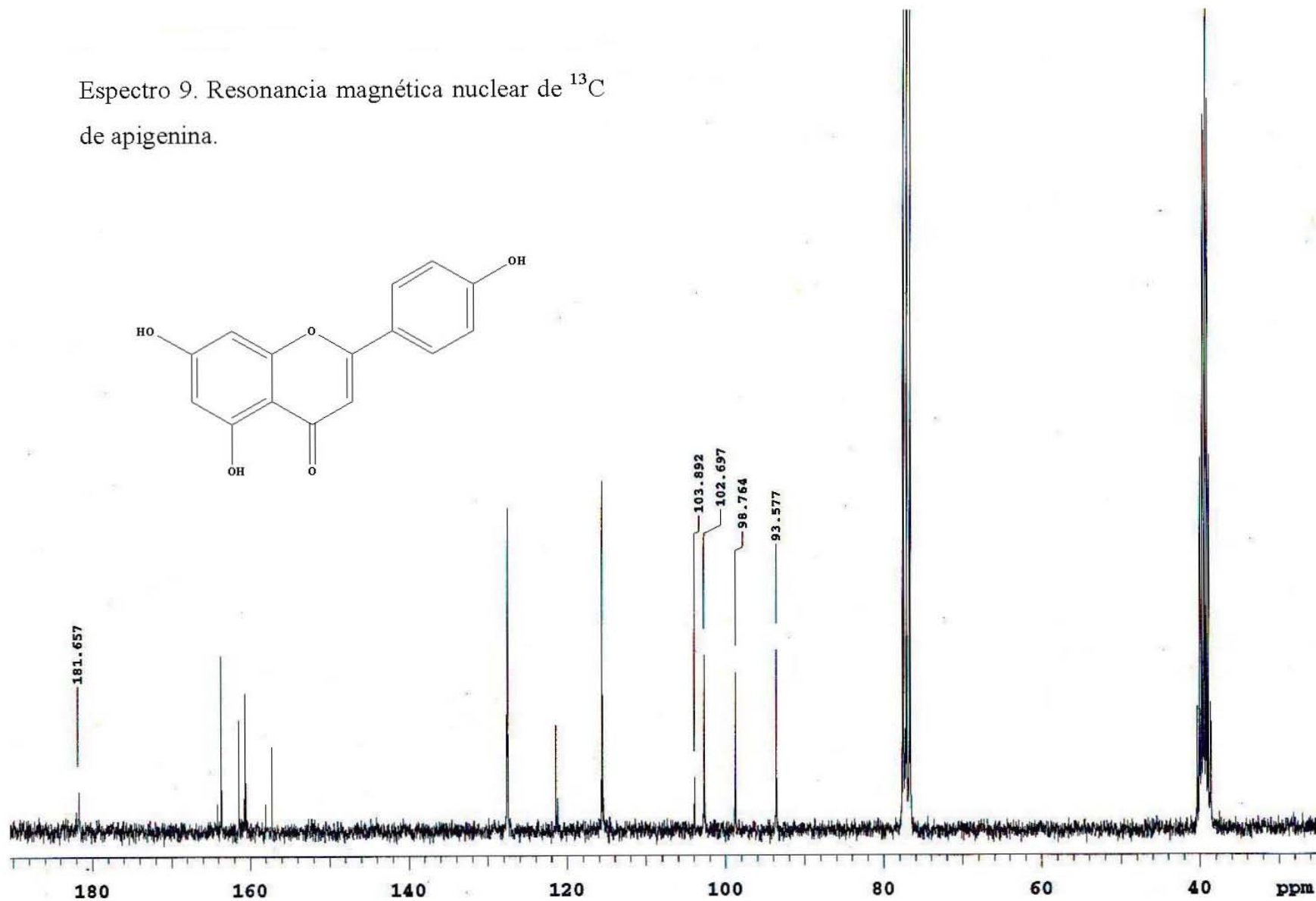
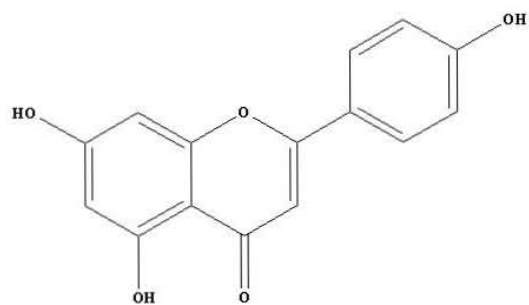
Espectro 7. Resonancia magnética nuclear de ^1H de apigenina.



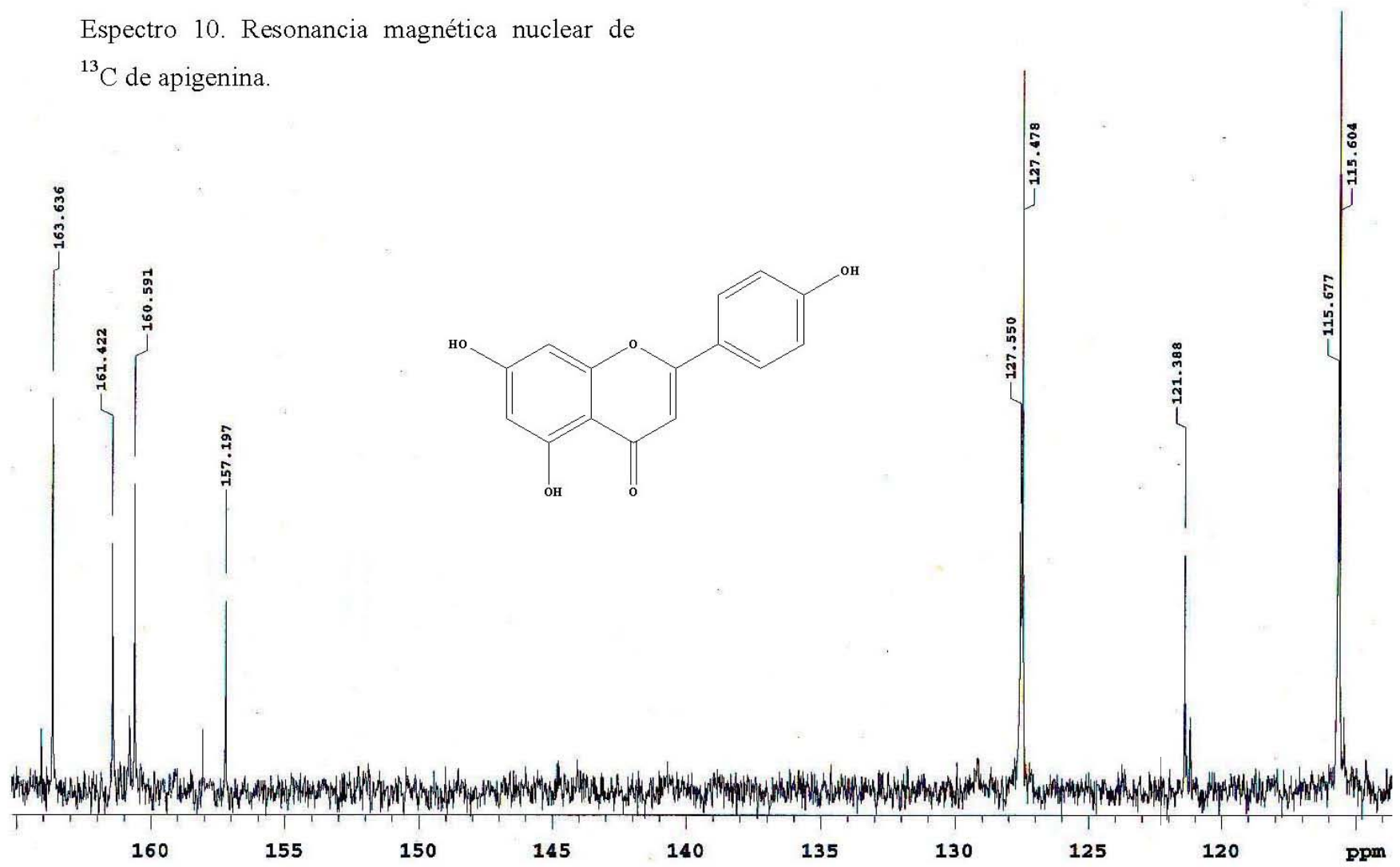
Espectro 8. Resonancia magnética nuclear de ^1H de apigenina con D_2O .



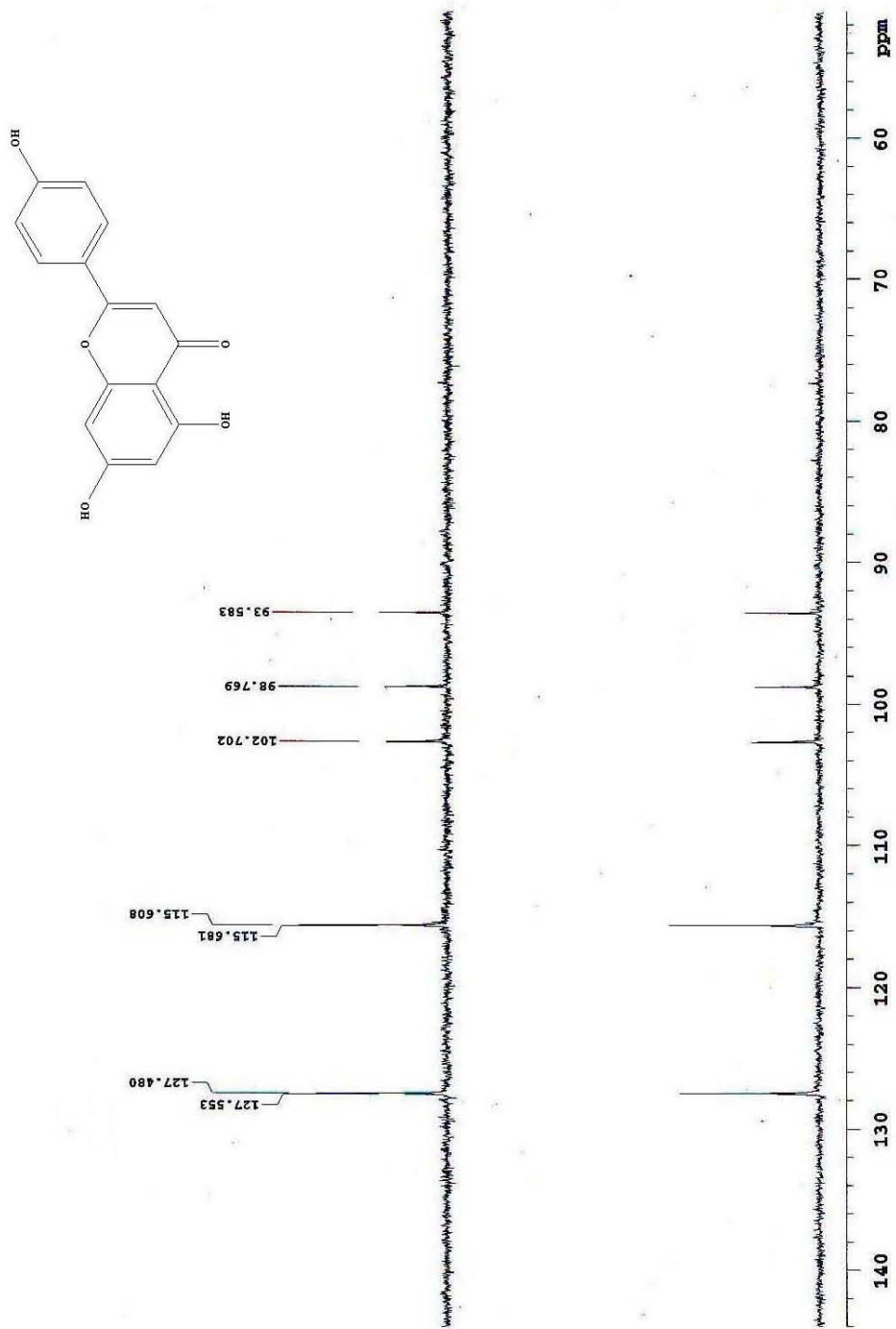
Espectro 9. Resonancia magnética nuclear de ^{13}C de apigenina.



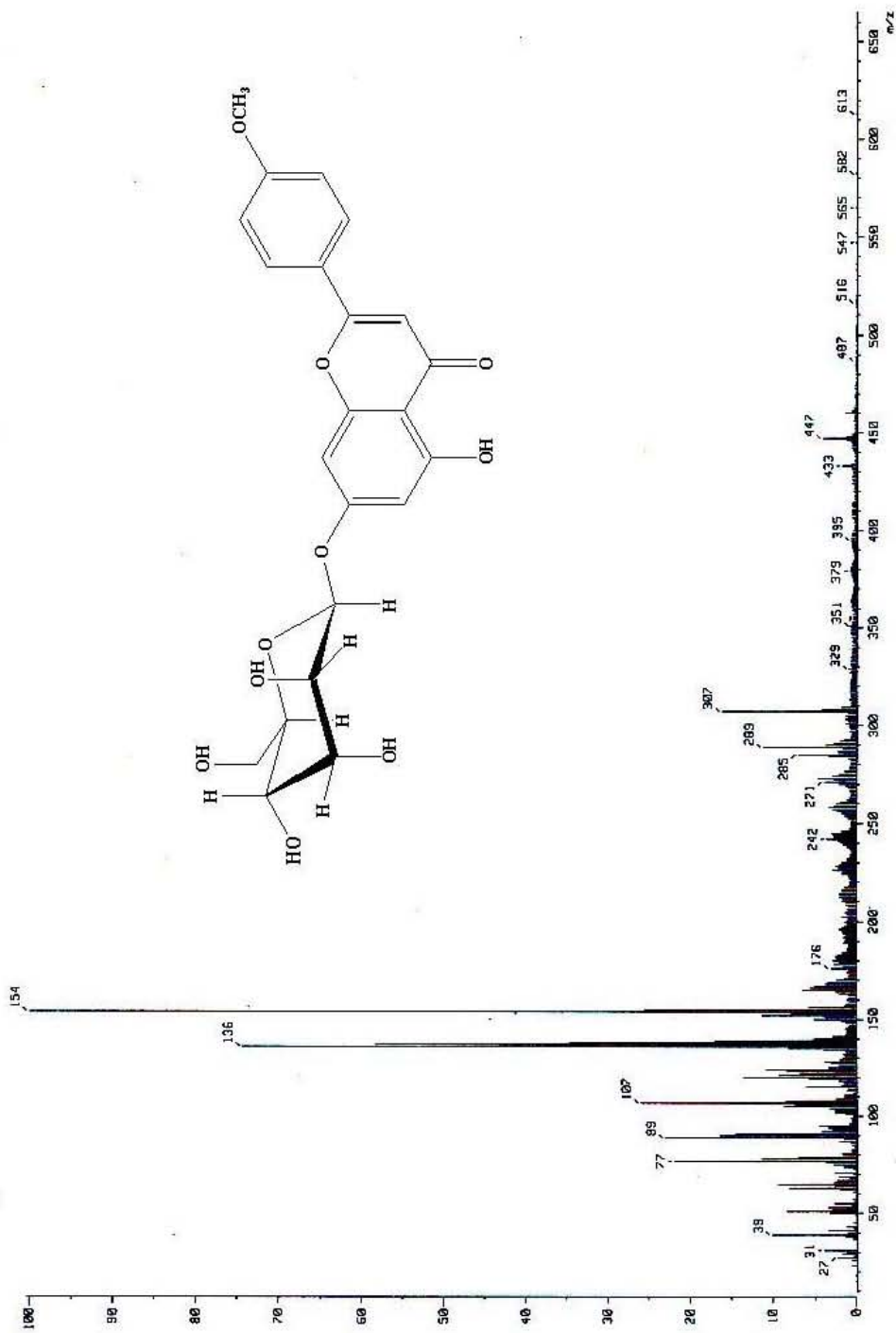
Espectro 10. Resonancia magnética nuclear de ^{13}C de apigenina.



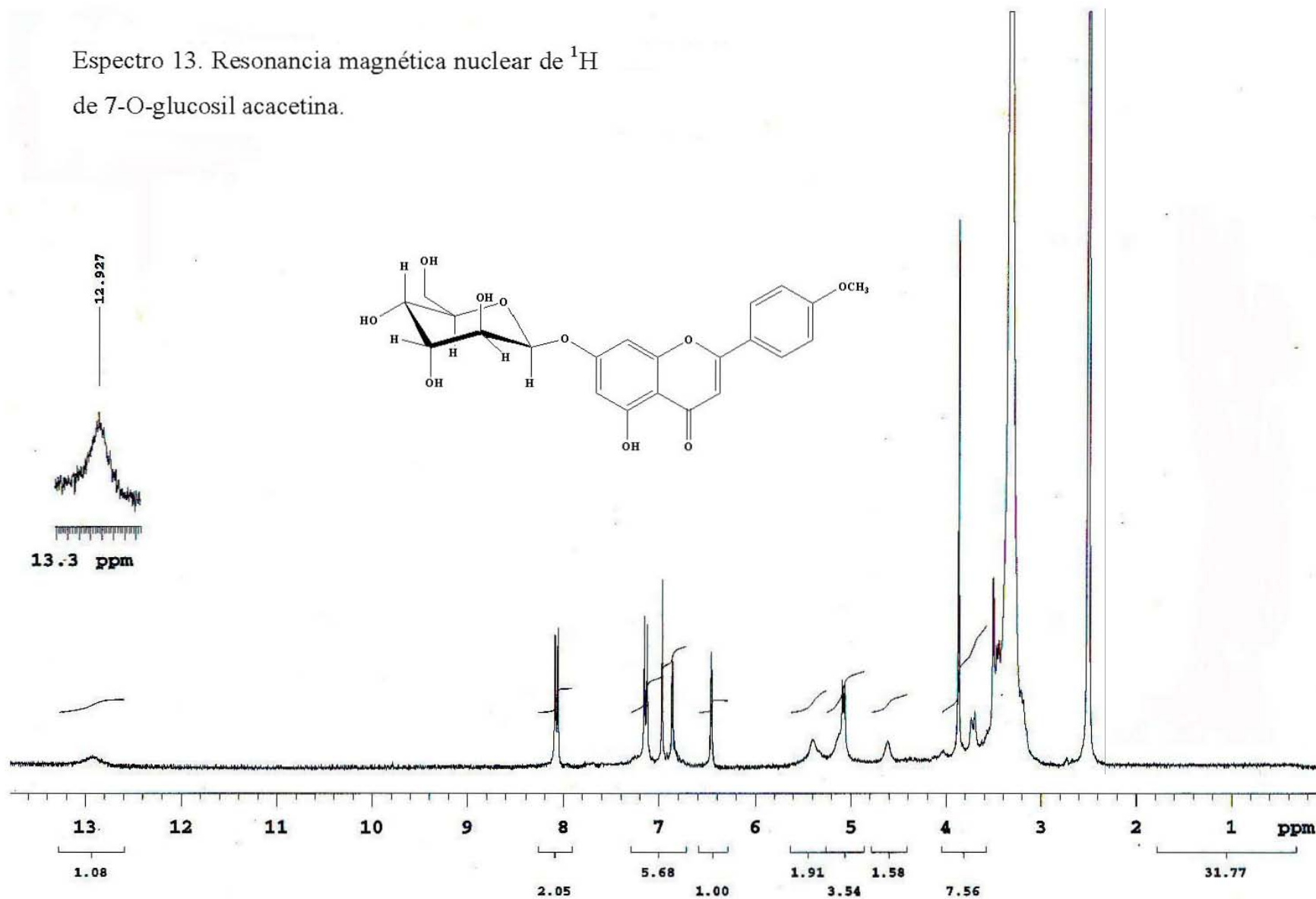
Espectro 11. DEPT de apigenina.



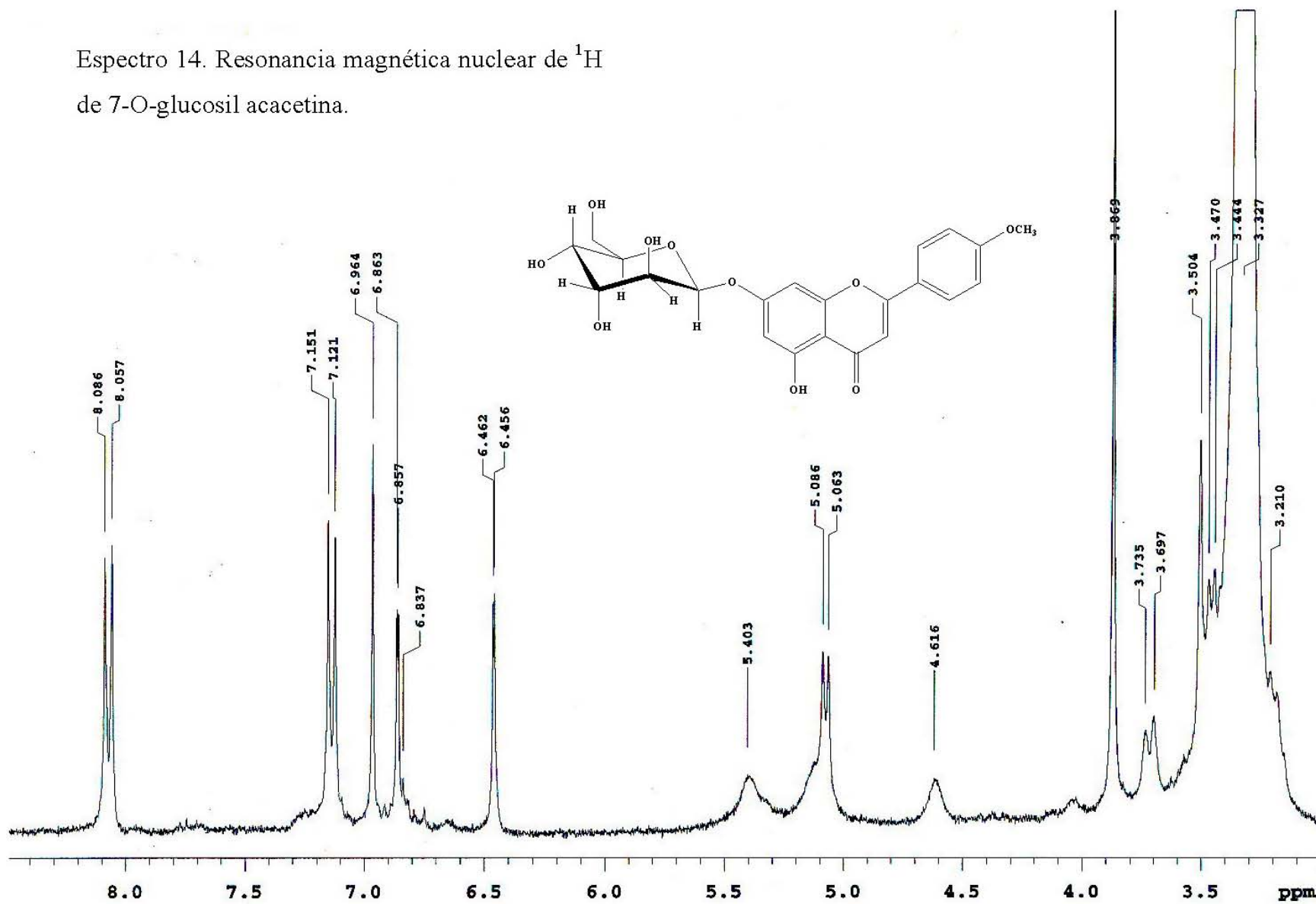
Espectro 12. Espectrometría de masas por FAB⁺ de 7-O-glucosil acetina.



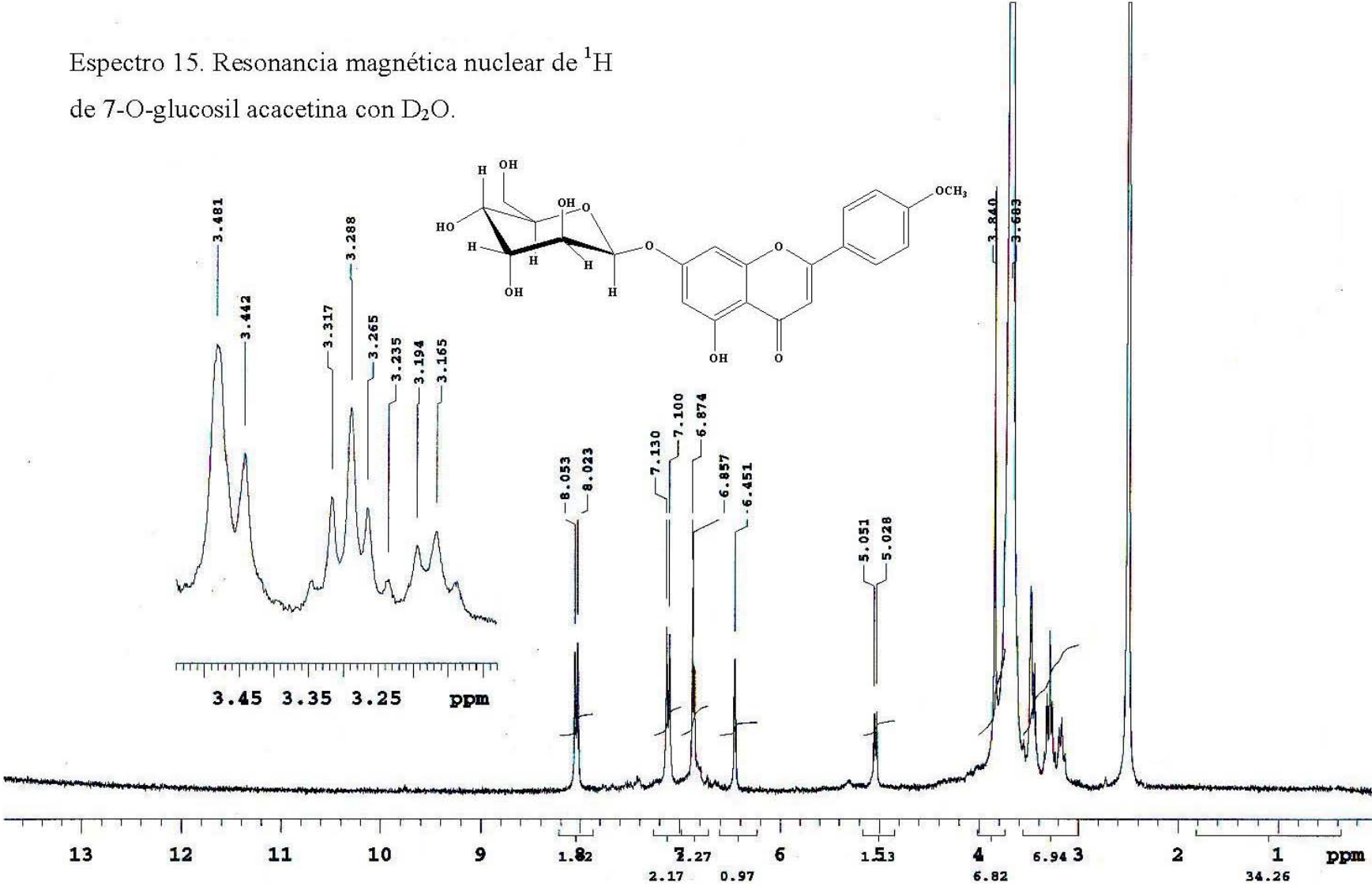
Espectro 13. Resonancia magnética nuclear de ^1H
de 7-O-glucosil acetina.



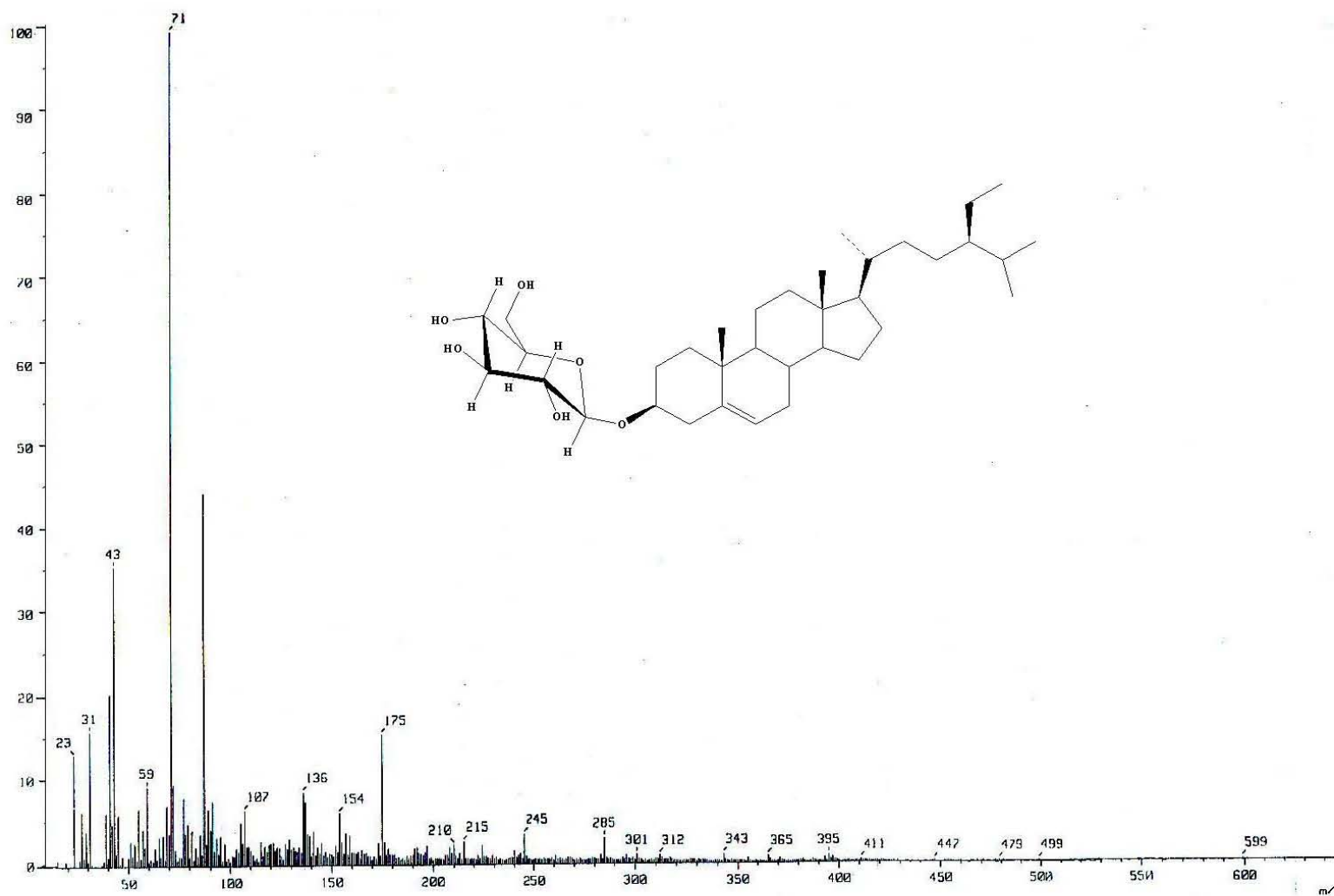
Espectro 14. Resonancia magnética nuclear de ^1H
de 7-O-glucosil acetina.



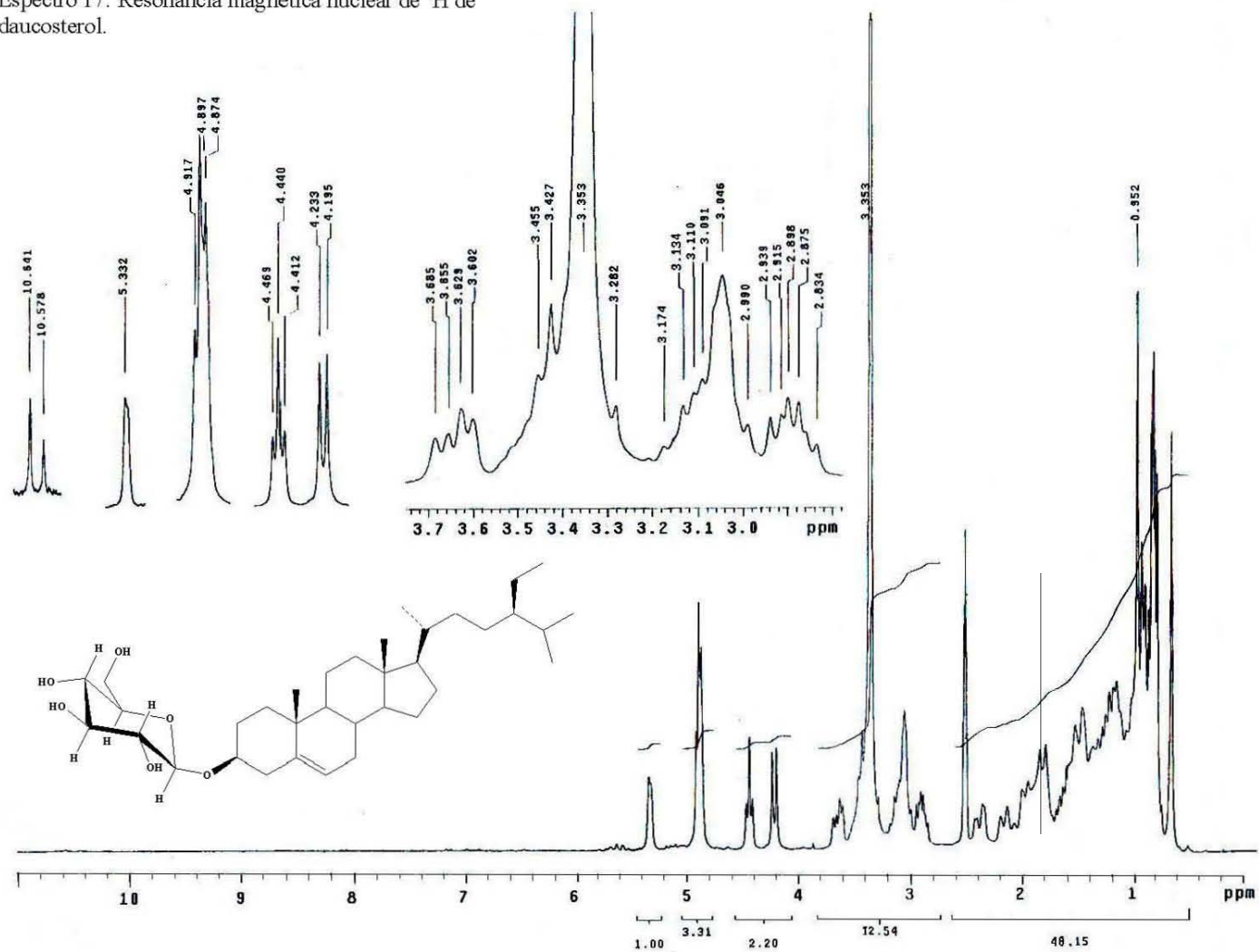
Espectro 15. Resonancia magnética nuclear de ^1H de 7-O-glucosil acetina con D_2O .



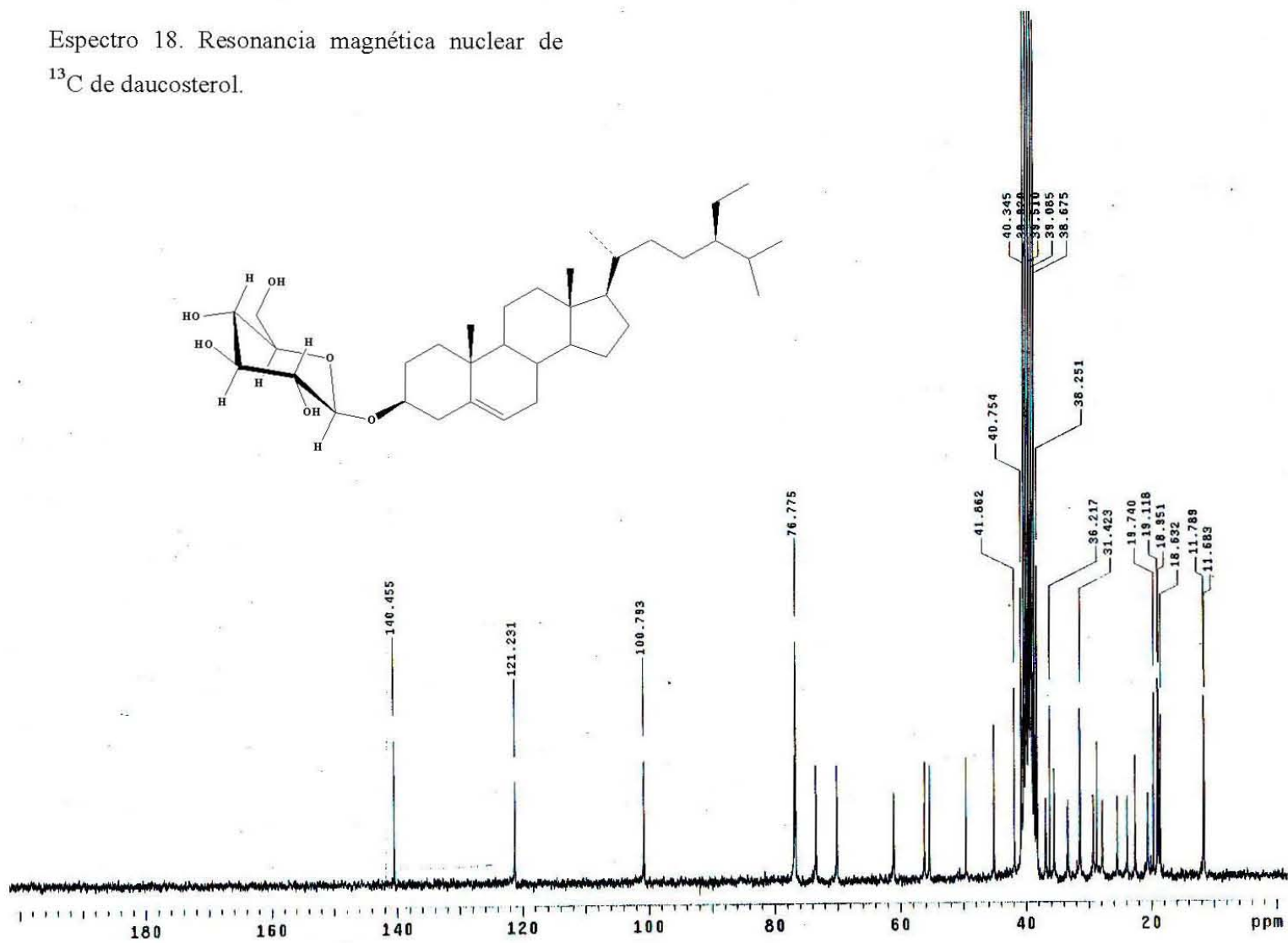
Espectro 16. Espectrometría de masas por FAB⁺ de daucosterol.



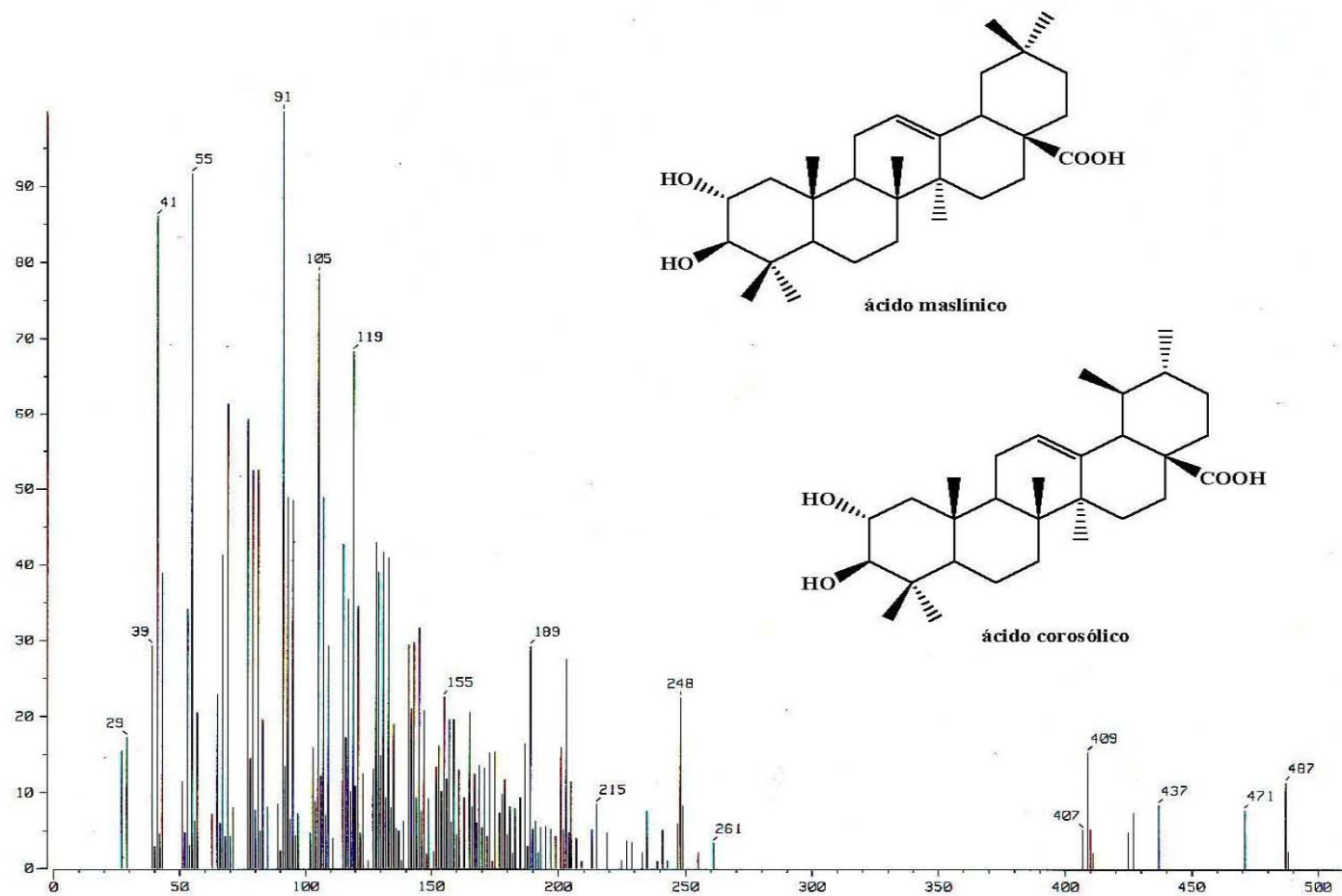
Espectro 17. Resonancia magnética nuclear de ^1H de daucosterol.



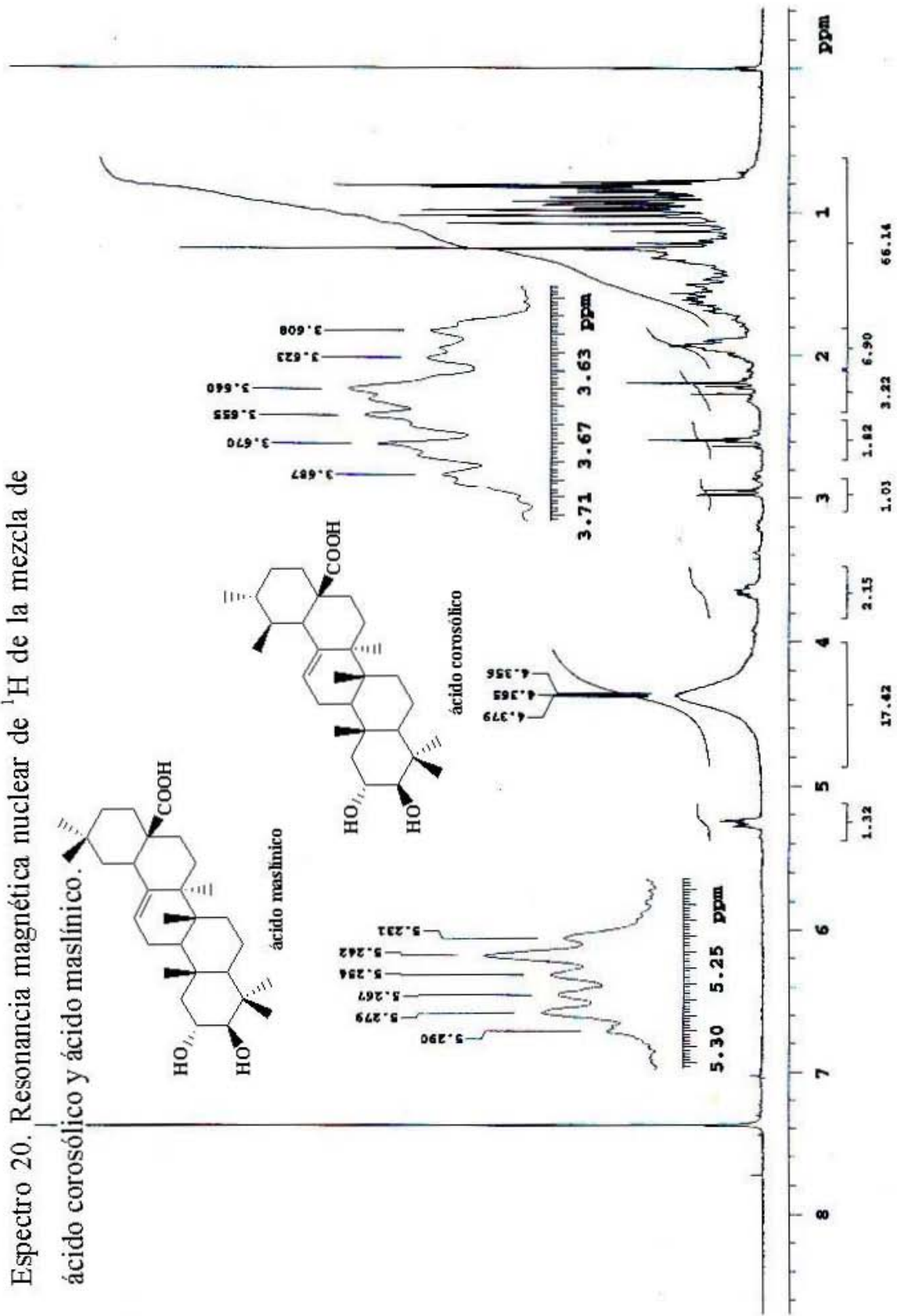
Espectro 18. Resonancia magnética nuclear de ^{13}C de daucosterol.



Espectro 19. Espectrometría de masas por FAB⁺ de la mezcla de ácido corosólico y ácido maslinico.



Espectro 20. Resonancia magnética nuclear de ^1H de la mezcla de ácido corosólico y ácido maslínico.



9. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Kurt, H. y Andrew, M., Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives. *Phytochemistry Reviews* 2002; 1: 275–285.
- ² Rodríguez-Landa, F.J., y Contreras, M.C., Algunos datos recientes sobre la Fisiopatología de los trastornos por ansiedad. *Revista Biomedica* 1998; 9 (3): 181-191.
- ³ Medina-Mora, M.E., Borges, G., Lara, M.C., Benjet, C., Blanco, J.J., Fleiz, B.C., Villatoro, V.J., Rojas, G.E., Zambrano, R.J., Casanova, R.L. y Aguilar-Gaxiola, S., Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultados de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. *Salud Mental* 2003; 26 (4): 1-16.
- ⁴ Kahnberg, P., Howard, H.M., Liljefors, T., Nielsen, M., Nielsen, O.E., Sterner, O. y Pettersson, I., The use of a Pharmacophore model for identification of novel ligands for the benzodiazepine binding site of the GABA_A receptor. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 2004; 23: 253-261.
- ⁵ Aguirre, H.E., Estudio Fitoquímico y Farmacológico de *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* y *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana*, Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Posgraduados del Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- ⁶ Wong, C.H., Smith, M. y Boon, S.H., Herbal Remedies in Psychiatric Practice., *Arch Gen Psychiatry* 1998; 55: 1033-1041.
- ⁷ Rodríguez-Hahn, L. y Cárdenas, J., *Current topics in Phytochemistry* 1999; 2: 91-102.
- ⁸ *The Medical and Poisonous plants of India*, Caius, F.J., 1th. edition, Publishers Jodupar, India, 1986.
- ⁹ *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas Mexicanas*, Martínez, M., 1^a. edición, Fondo de Cultura Económica, México, 1979.
- ¹⁰ Ahmadi, L. y Mirza, M., Volatile Constituents of *Dracocephalum aucheri* Boiss. *Journal of Essential Oil Research* 2001; 13 (3): 202-203. [Sólo se consultó el abstract]
- ¹¹ Shahram, Y.M. y Taffazoli, R., The essential oil of *Dracocephalum kotschy* Boiss. *Flavour and Fragrance Journal* 1988; 3 (2): 33-36. [Sólo se consultó el abstract]
- ¹² Misra, L.N., Shawl, A.S. y Raina, V.K., Volatile constituents of *Dracocephalum nutans*. *Planta Medica* 1988; 54 (2): 165-166. [Sólo se consultó el abstract]

-
- ¹³ Uchiyama, N., Kiuchi, F., Ito, M., Honda, G., Takeda, Y., Khodzhivatov, O.K. y Ashurmetos, A.O., New icetexane and 20-norabietane diterpenes with trypanocidal activity from *Dracocephalum komarovi*. *Journal of Natural Products* 2003; 66:128-151.
- ¹⁴ Holm, Y., Hiltunen, R. y Nykaenen, I., Capillary gas chromatographic-mass spectrometric determination of the flavour composition of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.). *Flavour and Fragrance Journal* 1988; 3 (3): 109-112. [Sólo se consultó el abstract]
- ¹⁵ Kakasy, A.Z., Lemberkovics, E., Kursinszki, L., Janicsak, G. y Szoke, E., Data to the phytochemical evaluation of moldavian dragonhead. *Herba Polonica* 2002; 48 (3): 112-119. [Sólo se consultó el abstract]
- ¹⁶ Li, J.B. y Ding, Y., Studies on chemical constituents from *Dracocephalum moldavica* L. *Journal of Chinese Materia Medica* 2001; 26 (10): 697-8. [Sólo se consultó el abstract]
- ¹⁷ Jamzad Z., Grayer, R.J., Kite, G.C., Simmonds S.J., Ingrouille, M. y Jalili, A., Leaf surface flavonoids in Iranian species of *Nepeta* (Lamiaceae) and some related genera. *Biochemical Systematics and Ecology* 2003; 31: 587-600.
- ¹⁸ Barberán, F.A.T. y Gil, M.I., Chemistry and natural distribution of flavonoids in the Labiatae, R. M. Harley and T. Reynolds (ed.). *Advances in Labiatae Science*, London: Royal Botanic Gardens, Kew. p.p. 299-305.
- ¹⁹ *Medicinal Natural Products*, Dewick, M. P., John Wiley and Sons, Inc., 605 Third Avenue, New York. NY 10158-0012,USA. p.p. 135-142.
- ²⁰ Hollman, P.C.H. y Katan, M.B., Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedical and Pharmacoterapeutics* 1997; 51:305-310.
- ²¹ Viola, H., et al., Apigenin, a Component of *Matricaria recutita* Flowers, is a Central Benzodiazepine Receptor-Ligand with Anxiolytic Effects. *Planta Medica* 1995; 61: 213-216.
- ²² Wolfman, C., Viola, H., Marder, M., Ardenghi, P., Wasowski, C., Schröder, N., Izquierdo, I., Rúveda, E., Paladini, A. y Medina, H.J., Pharmacological Characterization of 6-Bromo-3'-nitroflavone, a Synthetic Flavonoid with High Affinity for the Benzodiazepine Receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1998; 61 (3): 239-246.
- ²³ Avallone, R., Zanolli, P., Puia, G., Kleinschnitz, M. y Baraldi, M., Pharmacological Profile of Apigenin, a Flavonoid Isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochemical Pharmacology* 2000; 59: 1387-1394.

-
- ²⁴ Kahnberg, P., Lager, E., Rosenberg, C., Schougard, J., Camet, L., Sterner, O., Nielsen, O.E., Nielsen, M. y Liljefors T., Refinement and Evaluation of a Pharmacophore Model for Flavone Derivatives Binding to the Benzodiazepine Site of the GABA_A Receptor. *J. Med. Chem.* 2002; 45: 4188-4201.
- ²⁵ Marder, M., Estiú, G., Blanch, L.B., Viola, H., Wasowski, C., Medina, H.J. y Paladina, C.A., Molecular Modeling and QSAR Analysis of the Interaction of Flavone Derivatives with the Benzodiazepine Binding Site of the GABA_A Receptor Complex. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2001; 9 (2): 323-335.
- ²⁶ *Sistema Nervioso Central. Perspectivas terapéuticas con su fundamento farmacológico*, Esplugues, J., v. 5, 2ª edición, García Muñoz, Valencia, España 1981.
- ²⁷ *Anxiety disorders. An introduction to Clinical Management and Research*, Griez, J.L., John Wiley and Sons Ltd., U.K. 2001.
- ²⁸ *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Goodman, G.A., Hardman, G.J., Limbird, E.L., Molinoff, B.P. y Ruddon, W.R., 9ª. ed., McGraw-Hill Interamericana, México, D.F., 1996.
- ²⁹ *Invitación a la Neurociencia*, Purves, D., Augustine, J.G., Fitzpatrick, D., Katz, C.L., Lamantia, A.S. y McNamara, O.J., 1ª. ed., Medica Panamericana, Buenos Aires, Argentina., 2001.
- ³⁰ *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, edited by Bloom, F., Kupfer, D.J., Raven Press, Ltd., New York, 1995.
- ³¹ Wall, J.M., Competitive GABA_A receptor antagonists increase the proportion of functional high-affinity $\alpha 6$ subunit-containing receptors in granule cells of adult rat cerebellum. *Neuropharmacology* 2003; 44: 56-69.
- ³² Johnston, G.A.R., GABA_A Receptor Pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics* 1996; 69 (3): 173-198.
- ³³ File, E.S., Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behavioural Brain Research* 2001; 125: 151-157.
- ³⁴ Takeda, H., Tsuji, M. y Matsumiya, T., Changes in head-dipping behavior in the Hole-Board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *European Journal of Pharmacology* 1998; 350: 21-29.
- ³⁵ File, E.S. y Wardill, G.A., Validity of Head-Dipping as a Measure of Exploration in a Modified Hole-Board. *Psychopharmacologia (Berl.)* 1975; 44: 53-59.

-
- ³⁶ Pourgholami, H.M., Kamalinejad, M., Javadi, M. y Majzoob, S., Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in male mice. *Journal of Ethnopharmacology* 1999; 64: 167-171.
- ³⁷ Nogueira, E. y Vassilieff, S.V., Hypnotic, anticonvulsant and muscle relaxant effects of *Rubus brasiliensis*. Involvement of GABA_A-system. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 70: 275-280.
- ³⁸ López-Rubalcava, C., Piña-Medina, B., Estrada-Reyes, R., Heinze, G. y Martínez-Vázquez, M., Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimolia* in two anxiety paradigms: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Sciences* 2006; 78: 730-737.
- ³⁹ *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta*, Sidney, S. y Castellan, N.J., 3ª. Reimpresión, Trillas, México, 2003.
- ⁴⁰ Chapman & Hall/CRC, Dictionary of Natural Products on CD-ROM, versión 12:1, Copyright © 1982-2004. [Consulta: 12 Septiembre 2003].
- ⁴¹ Faizi, S., Ali, M., Saleem, R., Irfanullah y Bibi, S., Spectral Assignments and Reference Data. *Magnetic Resonance in Chemistry* 2001; 39: 399-405.