



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**Estudio fitoquímico de *Nernstia mexicana*  
(*Cigarrilla mexicana*) y su evaluación farmacológica sobre  
Sistema Nervioso Central**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Q. I VIANEY VASQUEZ RUIZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. MA. YOLANDA RÍOS GÓMEZ**

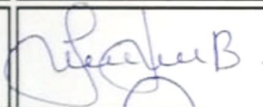
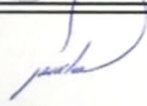

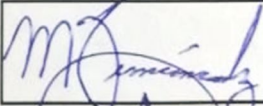
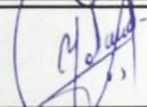
CUERNAVACA, MORELOS

DICIEMBRE 2019

DR. VICTOR BARBA LÓPEZ  
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS  
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada *Estudio fitoquímico de Nernstia mexicana (Cigarrilla mexicana) y su evaluación farmacológica sobre Sistema Nervioso Central* que presenta la alumna Vianey Vasquez Ruiz (10012812) para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Laura Patricia Alvarez Berber CIQ-UAEM	APROBADO	
Dr. Ismael León Rivera CIQ-UAEM	Aprobado	
Dr. Alejandro Zamilpa Alvarez Centro de Investigación Biomédica del Sur, IMSS	Aprobado	
Dr. Mario Fernández Zertuche CIQ-UAEM	Aprobado	
Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez CIQ-UAEM	Aprobado	

## ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
d	Señal doble
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
s	Segundos
HSQC	Heteronuclear single quantum coherente
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlación
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Señal simple
i.p	Vía intraperitoneal
p.o	Vía oral
cm	Centímetros
min	Minutos

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Familia <i>Rubiaceae</i> .....	5
2.1.1 Distribución.....	5
2.1.2 Taxonomía de la Familia <i>Rubiaceae</i> .....	6
2.2 Genero <i>Nerstia</i> .....	6
2.3 Antecedentes químicos de la Familia <i>Rubiaceae</i> .....	7
2.4 Composición química de <i>Nerstia mexicana</i> .....	15
2.5 Efectos biológicos de los metabolitos aislado de <i>Nerstia mexicana</i> .....	16
2.5.1 Ansiedad.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. HIPOTESIS .....	22
5. OBJETIVOS .....	24
5.1 Objetivo general.....	21
5.2 Objetivos específicos.....	21
6. METODOLOGÍA .....	26
6.1 Obtención de la materia prima.....	27
6.2 Obtención de los extractos.....	27
6.3 Procedimiento general.....	27
6.3.1 Separación cromatográfica de los constituyentes químicos del extracto acetónico de las partes aéreas de <i>Nerstia mexicana</i> .....	28
6.3.2 Purificación de los lavados del extracto acetónico ( Cromatografía en cartuchos superempacados).....	29
6.3.3 Recromatografía de la reunión A <sup>1</sup> de las aguas madres del extracto acetónico.....	29
6.3.4 Separación cromatográfica de los constituyentes químicos del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>Nerstia mexicana</i> .....	31
6.3.5 Acetilación de los extractos acetónico y metanólicos .....	31
6.4 Evaluación neurofarmacológicas.....	32
6.4.1 Animales.....	32
6.4.2 Fármacos y reactivos.....	32
6.4.3 Diseño experimental.....	33
6.4.3.1 Prueba de campo abierto.....	34
6.4.3.2 Prueba de tablero perforado.....	34

6.4.3.3 Prueba del cilindro de exploración.....	35
6.4.3.4 Prueba de laberinto elevado.....	35
6.4.3.5 Evaluación de la actividad anticonvulsiva.....	36
6.4.3.6 Evaluación de la actividad sedante-hipnótica.....	37
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
7.1.1 Ácido ursólico.....	39
7.1.2 Triacilgliceridos y poliprenoles.....	42
7.1.3 $\alpha$ -Tocoferol.....	44
7.1.4 Glucitol.....	48
7.2 Analisis CG-EM.....	50
7.3 Evaluación biológica.....	51
7.3.1 Evaluación del efecto ansiolítico.....	51
7.3.1.1 Prueba de campo abierto.....	51
7.3.1.2 Prueba de tablero perforado.....	52
7.3.1.3 Prueba de laberinto elevado.....	52
7.3.1.4 Evaluación de la actividad anticonvulsiva.....	53
7.3.1.5 Evaluación de la actividad sedante-hipnótica.....	54
7.4 Discusión de resultados.....	55
8. CONCLUSIONES.....	60
9. ESPECTROS.....	62
10. BIBLIOGRAFÍA.....	76


# 1.- INTRODUCCIÓN

## 1. Introducción:

En México existen alrededor de 4,000 especies de plantas que tienen atributos medicinales (aproximadamente 15% de la flora total reportada), lo que lo ubica como el cuarto país con mayor diversidad, detrás de Brasil, Colombia y China. Actualmente la medicina tradicional es un recurso fundamental para la salud humana. En algunas zonas rurales e indígenas son el único recurso disponible a falta de instituciones médicas y recursos económicos para la adquisición de medicina moderna. Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo sólo en 5% de estas especies.

Las plantas son organismos autótrofos, que tienen un metabolismo primario presente, como todos los seres vivos. De igual forma, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, se distribuyen entre grupos taxonómicos que presentan propiedades biológicas y ecológicas, y se diferencian por sus usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. Los metabolitos secundarios pueden ser aislados de cualquier organismo, como hongos, bacterias, plantas o animales. Estos no son indispensables para la vida, siendo característicos de cada especie y responsables de su actividad biológica. Existe una gran variedad estructural de ellos: alcanos, flavonoides, terpenoides, lignanos, glucósidos etc., los cuales presentan importantes propiedades biológicas y farmacológicas, debido a que estos compuestos son una fuente prometedora para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos contra una gama de afecciones presentes en nuestro día a día.<sup>1</sup>

*Nernstia mexicana* (*Cigarrilla mexicana*) es una planta que crece en la zona de Hidalgo, Querétaro y San Luis Potosí. Es un arbusto con flores. Pocos han sido los reportes sobre su composición química. Estos estudios hacen referencia a su uso para el tratamiento de amibiasis y como emético, sin embargo, los pobladores de la zona central del país lo utilizan empíricamente para tratar cuadros de ansiedad, lo que asociamos con afecciones del Sistema Nervioso Central (SNC) y su posible actividad como sedante y tranquilizante. Con el objetivo de



buscar nuevos agentes con estas dos actividades, el equipo de investigación ha estudiado el potencial antidepresivo de algunos extractos de plantas. Esta última actividad biológica ha llamado la atención del grupo de investigación para asociarla, de acuerdo con su uso popular, al estudio de *N. mexicana*, estableciendo su composición química, para demostrar su actividad biológica como tranquilizantes y sedantes.



## 2.- ANTECEDENTES

## 2. Antecedentes:

### 2.1 Familia *Rubiaceae*

#### 2.1.1 Distribución

*Rubiaceae* es una familia de plantas llamadas normalmente rubia, galio blanco, o familia del café. Las *Rubiaceae* representan una de las cinco familias de angiospermas más ricas; ya que cuenta con más 13,000 especies clasificado en 620 géneros, 40 tribus, y 8 subfamilias (*Cinchonoideae*, *Ixorioideae*, *Guettardoideae*, *Urophyllloideae*, *Pamazotoideae*, *Gleasonioideae*, *Rubioideae* y *Hilliodeae*). Los géneros más representativos de esta familia son: *Carlemannia*, *Gaertnera*, *Pagamea*, *Silvianthus*, *Burchellia*, *Chomelia*, *Coffea*, *Scyphiophora*, *Galium*, *Genipa*, *Gardenia*, *Paederia*, *Macrosphyra*, *Schenckia*, *Canthium*, *Canthium* y *Rubia*, entre otras.

La mayoría de las especies de esta familia viven en regiones tropicales y subtropicales, sin embargo se han encontrado algunas en el continente Antártico, como es el caso de *Coprosma*, *Galio* y *Sherardia*.<sup>2</sup>



**Fig.1** Distribución geográfica de la familia *Rubiaceae*

En México, la familia *Rubiaceae* cuenta con 77 géneros endémicos y ocho introducidos, comprendiendo aproximadamente 533 especies.

### 2.1.2 Taxonomía de la Familia Rubiaceae

La diversidad en esta familia es enorme, incluye arbustos, plantas erectas, postradas y trepadoras, a veces herbáceas o leñosas, tallos con espinas rectas, curvas o sin espinas. También incluye grandes árboles de selva tropical. Algunas de sus especies producen diferentes tipos de frutas con variados tipos de mecanismos de dispersión y acumulación de sustancias químicas.<sup>3</sup>



**Fig.2** Características morfológicas de la familia *Rubiaceae*

### 2.2 Género *Nernstia*

Dentro de los géneros pertenecientes a la subfamilia *Rubioideae* se encuentra *Nernstia*, que incluye una sola especie *Nernstia mexicana*, también conocida como *Cigarrilla mexicana* o *Acaloxochilt*.



**Fig.3** Morfología del género *Nernstia*

En México *Nernstia mexicana* crece en la zona de Hidalgo, Querétaro y San Luis Potosí.<sup>2</sup>



**Fig.4** Distribución geográfica del género *Nernstia* en México

### 2.3 Antecedentes químicos de la familia *Rubiaceae*

La familia de las rubiáceas es una de las más variadas y ricas desde el punto de vista biológico y químico. La mayoría de sus miembros se caracterizan por su contenido de terpenos, alcaloides, antraquinonas, flavonas y polifenoles, muchos de los cuales presentan actividad biológica. A continuación, se describen brevemente algunos metabolitos secundarios aislados de especies pertenecientes a esta familia.

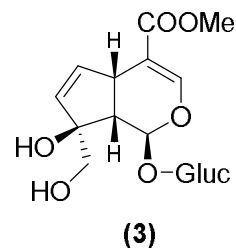
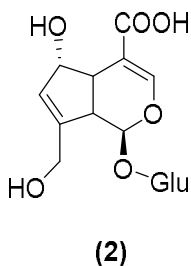
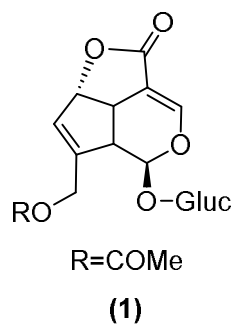
#### Terpenos

Dentro de este grupo de sustancias se han aislado monoterpenos, diterpenos, esteroides y triterpenos.

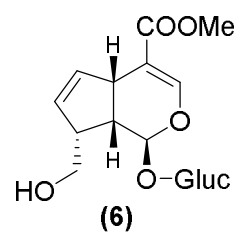
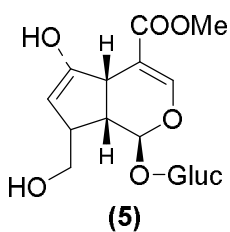
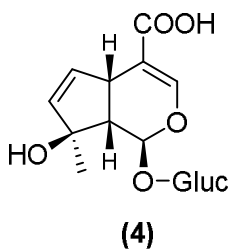
##### A) Monoterpenos

Los monoterpenos más frecuentemente aislados de este grupo de plantas son los iridoides, cuya presencia en las plantas de la familia Rubiaceae ha sido estudiada con fines quimiotaxonómicos. Se ha encontrado que el asperulósido **(1)** y los glicósidos *Galium* [ácido desacetil asperulosídico **(2)**] se encuentran en casi todas las plantas de la subfamilia Rubioideae, pero no se presentan en otras subfamilias. Los glicósidos *Gardenia* [como el gardenósido **(3)**] son detectables en algunas plantas de la tribu *Gardenieae* de la subfamilia Ixoroideae, pero no

en otras tribus de la misma subfamilia y estos tres tipos de glicósidos no se encuentran en otras subfamilias.<sup>4</sup>

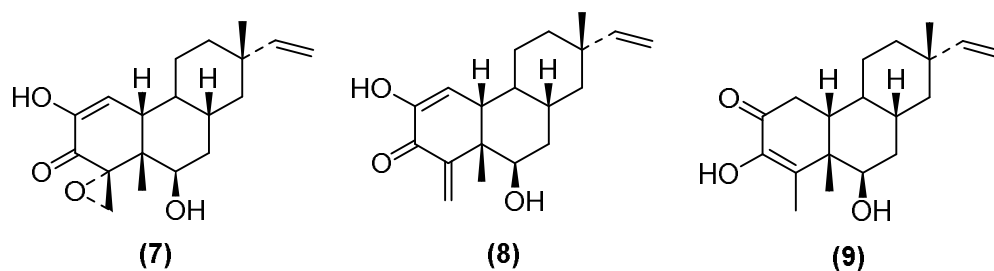


Además de las implicaciones quimiotaxonómicas que tienen iridoides en esta familia, muchos de estos metabolitos secundarios se han caracterizado por su importancia desde el punto de vista de la medicina tradicional, pues han llegado a manifestar una gran variedad de actividades farmacológicas. Un ejemplo de ello son los frutos de *Gardenia jasminoides*, que son usados como una droga por sus efectos antiflogísticos. Numerosos estudios químicos han sido realizados a esta especie, los que han permitido determinar que el gardenósido **(3)**, el shanzhisido **(4)** y el éster metílico del ácido desacetil asperulosídico **(5)** fueron aislados de las frutas y hojas de la planta. Casi simultáneamente, de sus frutos fue aislado el genipósido **(6)**.<sup>5,6</sup>

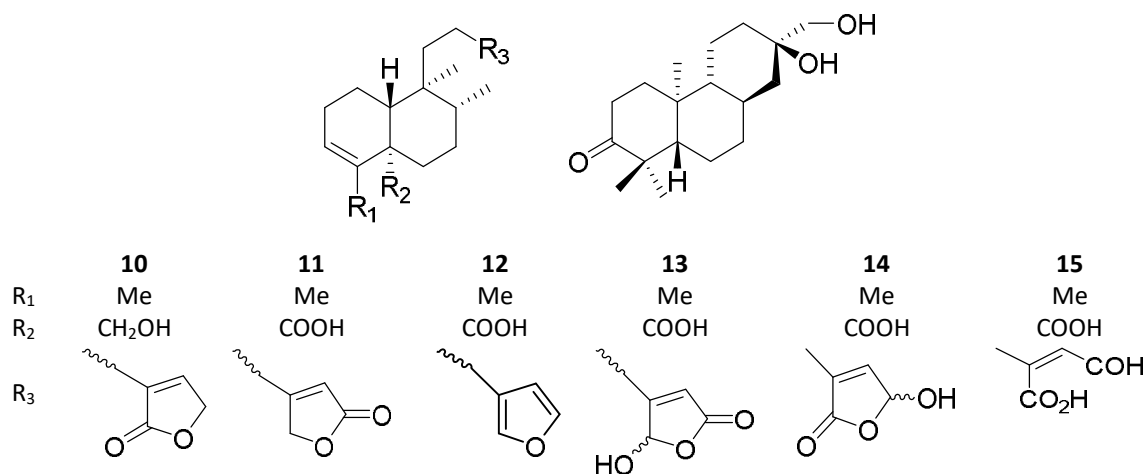


## B) Diterpenos

Son compuestos menos frecuentemente caracterizados que los iridoides en este grupo de plantas, sin embargo, merecen mención ya que algunos han manifestado propiedades anticancerígenas,<sup>7</sup> como los compuestos aislados del extracto metanólico de la corteza y madera de *Rondeletia panamensis*, de donde fue posible aislar oxidopanamsina **(7)**, panamsina **(8)**, y rondeletina **(9)**.<sup>8</sup>

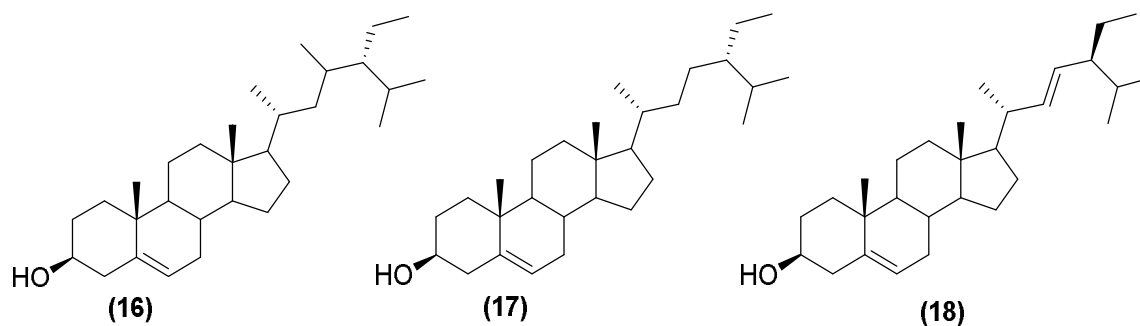


Seis nuevos compuestos diterpénicos fueron aislados de *Hoffmannia strigillosa*, planta usada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades estomacales: estrigilanol (**10**) y los ácidos estrigilanoico A-D (**11-15**).<sup>9</sup>



### C) Esteroles

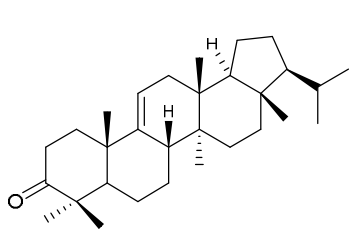
Los esteroides principalmente aislados de las plantas de la familia Rubiácea son el fitoesterol,  $\beta$ -sitosterol (**17**) y estigmaesterol (**18**).<sup>10</sup>



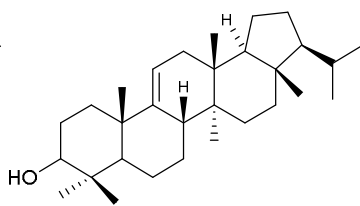
## D) Triterpenos

Cuatro tipos de esqueletos triterpénicos han sido aislados hasta ahora de este grupo de plantas: damarano, lupano, oleanano y ursano, estos dos últimos tipos de compuestos existen como saponinas y/o sapogeninas.

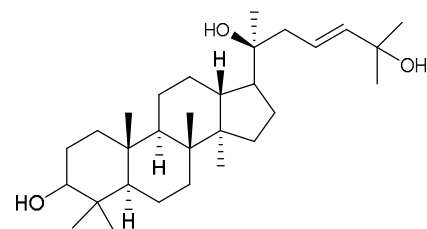
Dentro de los triterpenos con esqueleto damarano podemos mencionar a la arborinona **(19)** e isoarborinol **(20)** aislados de hojas de *Hediotys acutangula*.<sup>11</sup> Así como los isofouquierol **(21)**, dammarenediol-II **(22)** y (20S)-dammar-24-ene-3B,20,26-triol **(23)**, la cucurbitacina F **(24)** y la cucurbitacina D **(25)**, aislados de las hojas de *Cucumis dinteri*.



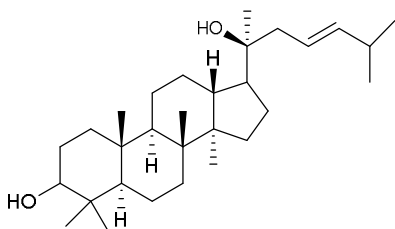
**(19)**



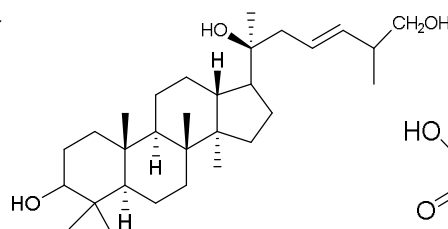
**(20)**



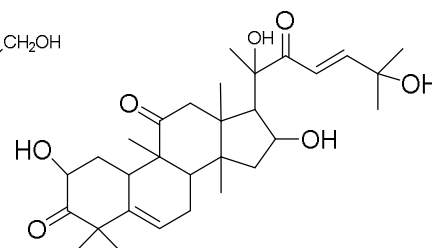
**(21)**



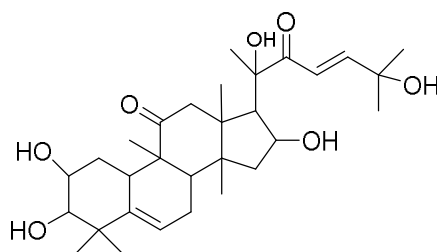
**(22)**



**(23)**

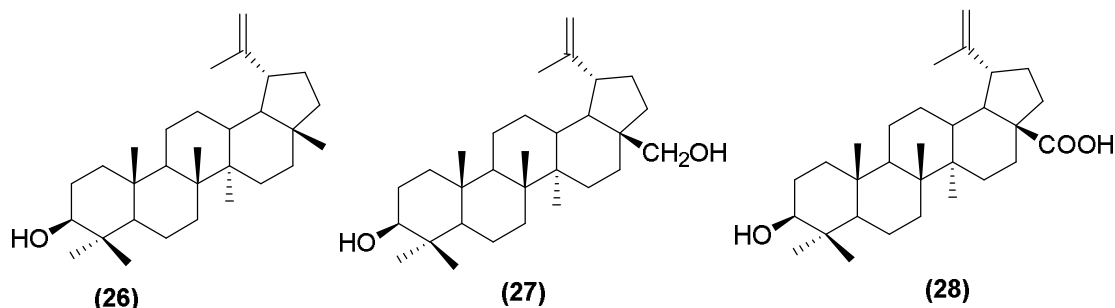


**(24)**

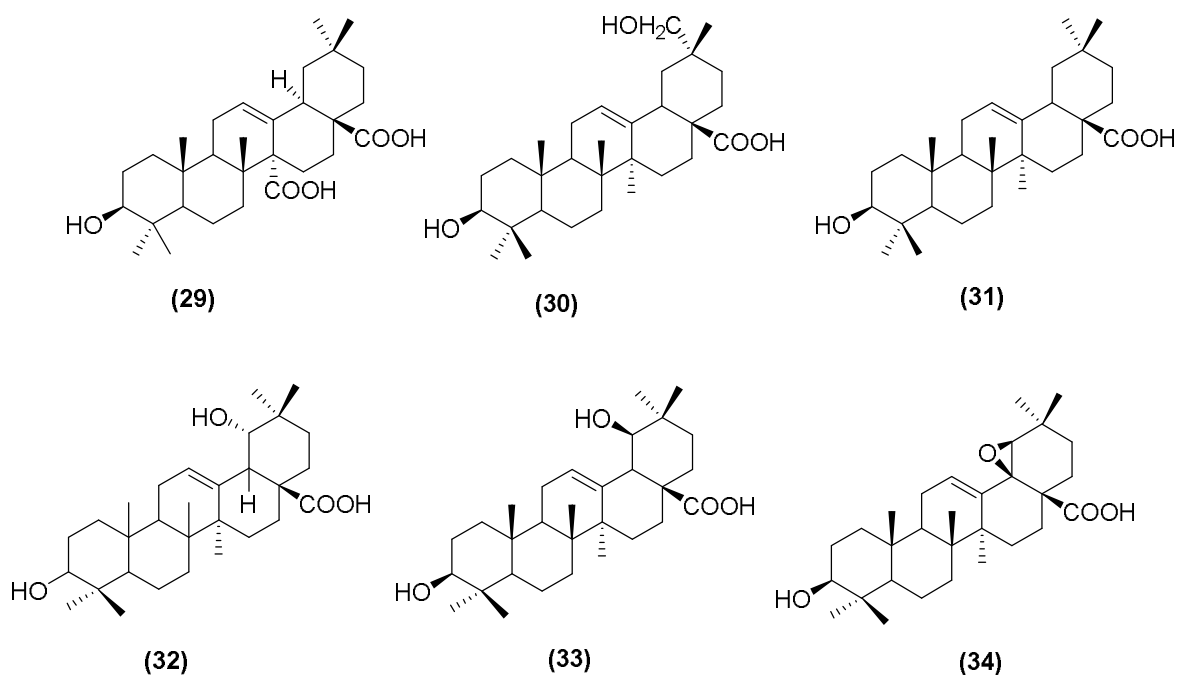


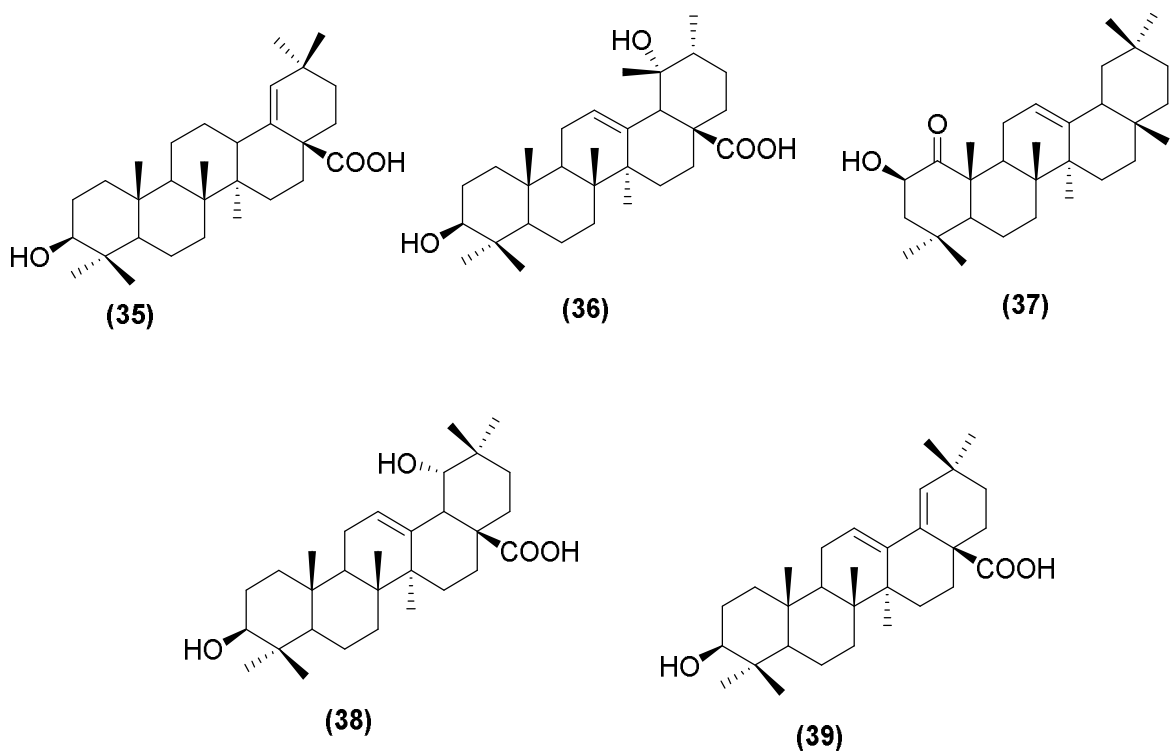
**(25)**

En el grupo de triterpenos con esqueleto de tipo lupano se lograron aislar de las hojas de *Ixora chinensis* al lupeol **(26)** y la betulina **(27)**, y de los tallos de *Adina pilufera* al ácido betulínico **(28)**.<sup>11</sup>

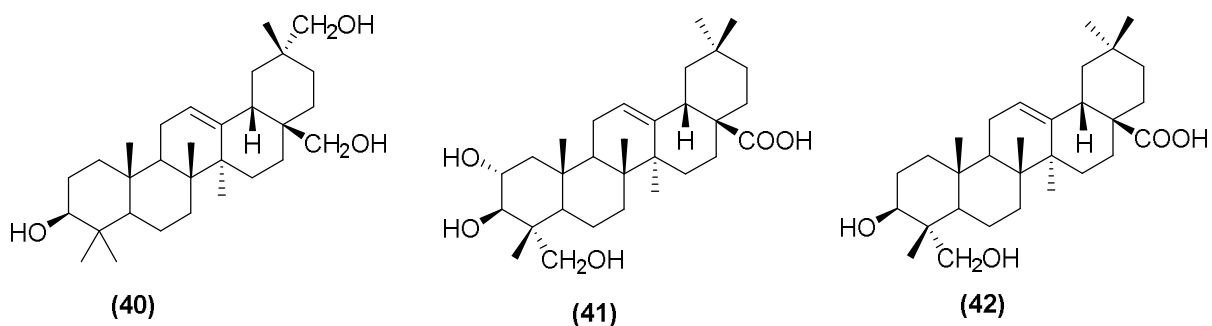


En el grupo de terpenos con esqueleto oleanano se ha reportado el estudio de tres especies de *Randia* en los que se logró aislar el ácido cincólico **(29)** de las hojas de *R. canthiodes*, el ácido mesembriantemoidegenico **(30)** de *R. sinensis*, al ácido oleanólico **(31)**, ácido siareainólico **(32)** y los nuevos ácidos espinósico A **(33)** y espinósico B **(34)** de *R. spinosa*.<sup>12</sup> En el estudio de los tallos de *Adina pilufera* se logró aislar ácido morolico **(35)**.<sup>11</sup> Los frutos de *R. dumetorum* se utilizaron como un efectivo veneno para peces. Éstos contienen a **31**, ácido pomólico **(36)**<sup>13</sup> y tres triterpenos nuevos, el 1-ceto-3 $\alpha$ -hidroxi-oleanano **(37)**<sup>14</sup> y los ácidos randílico A **(38)** y B **(39)**.<sup>12</sup>



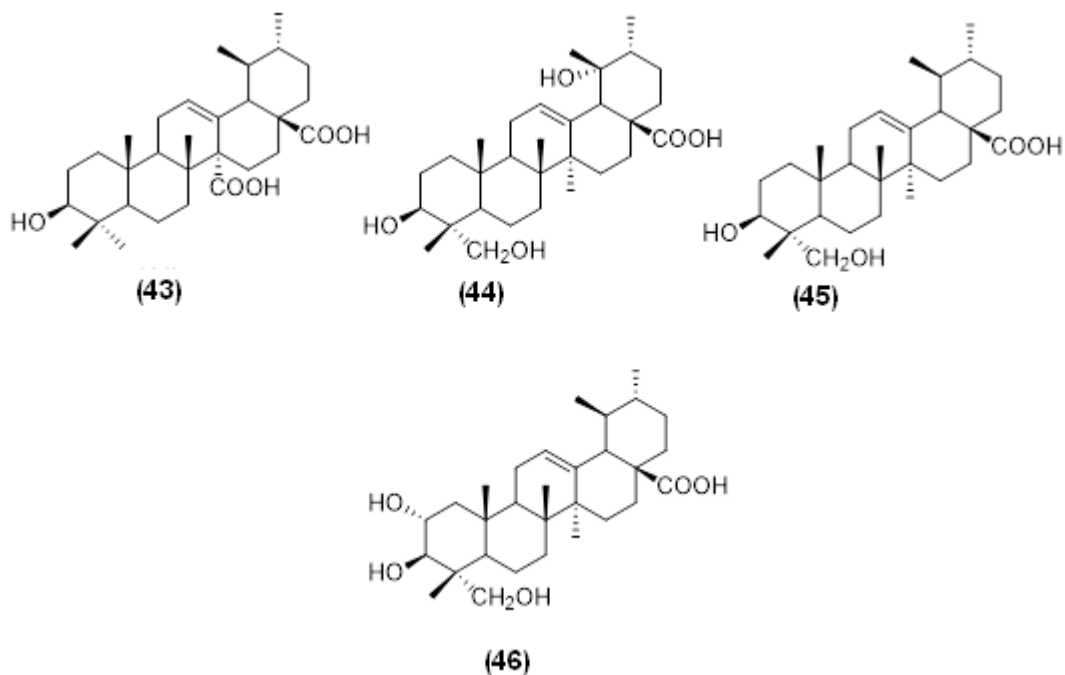


De los tallos de *Hedyotis acutangula* se aisló por primera vez en forma natural al oleanano-ae-eno-3 $\beta$ ,28,29-triol<sup>15</sup> (**40**) y de *H. lawsonii* el ácido arjunólico (**41**), el ácido oleanólico (**31**)<sup>16</sup> y el saposinido E (**42**).<sup>17</sup>



Dentro de los triterpenos con esqueleto de ursano, en *Guettarda angelica* se han encontrado al ácido quinóvico (**43**),<sup>18,19,20</sup> al ácido rotundico (**44**) y al nuevo ácido 3 $\beta$ -23-dihidroxi-urs-12-en-28-oico (**45**), que también se encuentra en *Cigarrilla mexicana*<sup>21</sup> y *Hedyotis lawsoniae*. De

las semillas de *Ilex rotunda* se aisló además el ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,24-trihidroxi-urs-12-en-28-oico (46).<sup>22</sup>

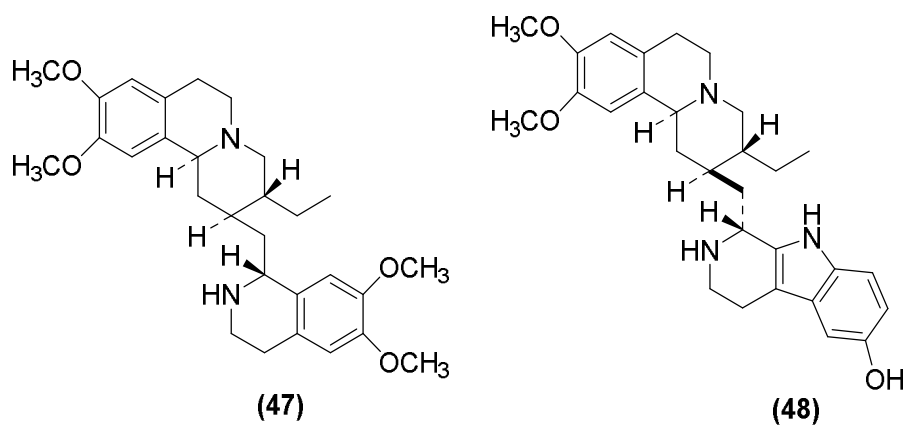


## Alcaloides

La familia Rubiaceae es una de las principales productoras de alcaloides, los que se clasifican en tres grandes grupos: isoquinolínicos, quinolínicos e indólicos.

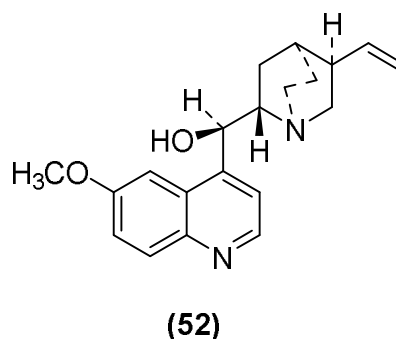
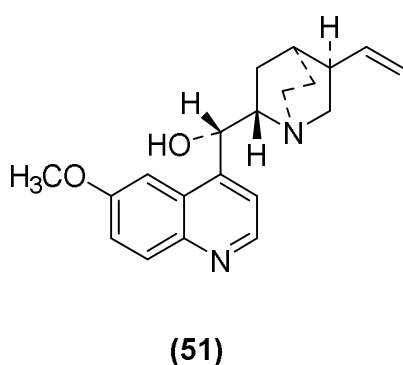
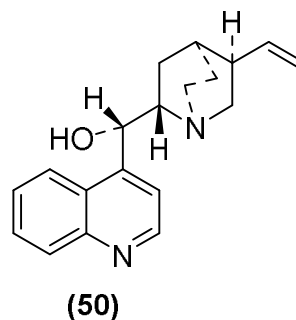
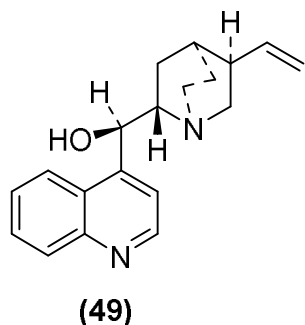
### Alcaloides isoquinolínicos

Los alcaloides isoquinolínicos se encuentran representados por la emetina (47) y la tubulosina (48), así como todos sus derivados.<sup>22</sup>



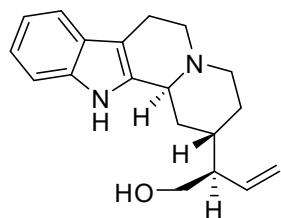
## Alcaloides quinolínicos

Se han aislado principalmente en especies del género *Cinchona*. Estos alcaloides son sustancias importantes desde el punto de vista farmacológico pues presentan gran variedad de actividades, por ejemplo, la cinconidina **(49)**, la cinconina<sup>23</sup> **(50)**, la quinidina **(51)** y la quinina<sup>24</sup> **(52)** aisladas de *Cinchona occidentalis* presentan actividad antimalarica.<sup>25</sup>

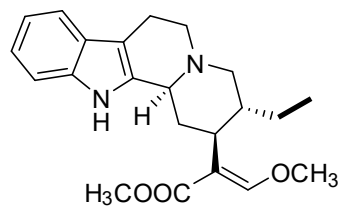


## Alcaloides indólicos

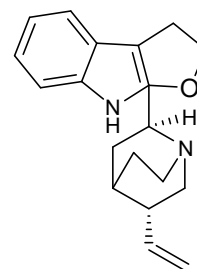
Los alcaloides indólicos se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas pertenecientes a esta familia ya que se han aislado en al menos diez géneros: *Antirhea*, *Cephalanthus*, *Cinchona*, *Coffea*, *Guettarsa*, *Hedyotis*, *Mitragyna*, *Palicourea*, *Psychotria* y *Riccardia*. La antirrhina **(53)** es un ejemplo de este tipo de alcaloides, que ha sido aislado de *Antirhea putaminosa*.<sup>26</sup> De *Cephalanthus occidentalis* se han aislado hasta ahora dos metabolitos secundarios pertenecientes a este grupo de sustancias: dihidrocorinanteina **(54)** y hirsutina **(55)**, este último, un bloqueador ganglionar.<sup>27</sup>



(53)



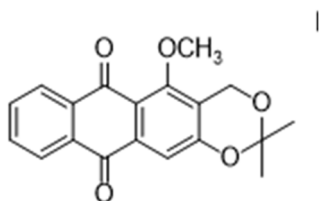
(54)



(55)

### Antraquinonas y cumarinas

Son compuestos poco frecuentes en este grupo de plantas. Los productos naturales pertenecientes a esta categoría se limitan a la antraquinona lucidina **(56)** (1,3-dihidroxi-2-hidroximetilantraquinona), aislada de *Morinda cotrifolia*, y las diez nuevas cumarinas **(57-62)** aisladas de *Coutarea hexandra*.<sup>27</sup>



**59** OCH<sub>3</sub> H

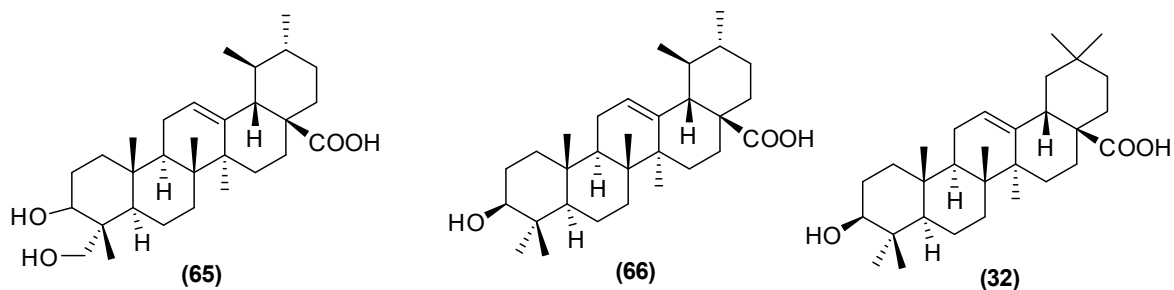
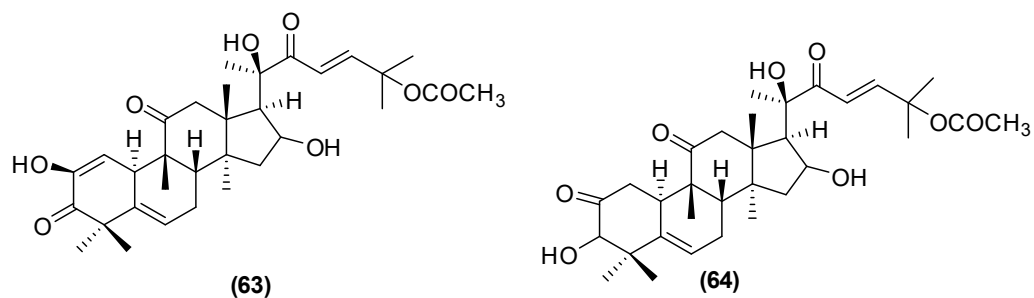
**60** OH H

**61** OCH<sub>3</sub> OH

**62** OH OH

### 2.4 Composición química de *Nerstia mexicana*

De la especie *Nerstia mexicana* se aislaron los triterpenos curcubitacina E **(63)**, isocucurbitacina B **(64)**, 3 $\beta$ ,23-dihidroxi-urs-12-en-28-oico **(65)**, así como ácido ursólico **(66)** y oleanólico **(31)**.<sup>21</sup>



## 2.5. Efectos biológicos de los metabolitos aislados de *Nerstia mexicana*

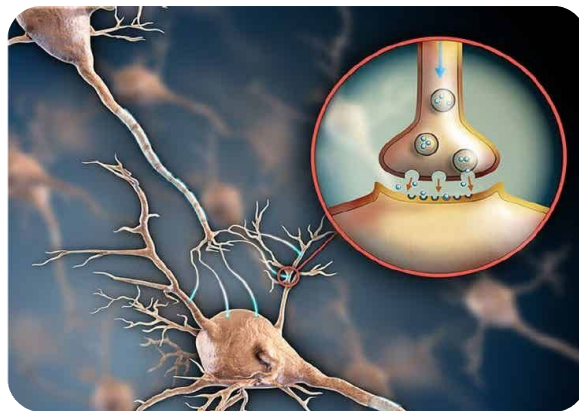
En México las partes aéreas de *Nerstia mexicana* son utilizadas para el tratamiento de amibiasis y como emético. Adicionalmente, los pobladores de la zona central del país la utilizan empíricamente para tratar cuadros de ansiedad, lo que asociamos con las actividades sedante y tranquilizante, esto debido a la presencia del ácido ursólico un metabolito activo abundante en *Nerstia mexicana* (Fig 5).



**Fig.5** Metabolito abundante de *Nerstia*

### 2.5.1 Ansiedad

Los trastornos de ansiedad (**Fig. 6**) se define como combinación de distintas manifestaciones físicas y mentales que no son atribuibles a peligros reales, sino que se manifiestan ya sea en forma de crisis o bien como un estado persistente y difuso, pudiendo llegar al pánico.<sup>28</sup> Este trastorno causa costos significativos en términos de uso de atención médica, discapacidad, pérdida de productividad y calidad de vida de los pacientes. Además, el riesgo de suicidio aumenta con los trastornos de ansiedad aguda y crónica. Los efectos secundarios de la medicación son una limitación importante para la adherencia y el tratamiento exitoso de los pacientes y llaman la atención sobre la necesidad de nuevas alternativas de tratamiento. Las terapias herbales pueden ser alternativas efectivas en el tratamiento de la depresión, como el caso de la hierba de San Juan<sup>29</sup> y la búsqueda de una nueva farmacoterapia a partir de plantas medicinales y compuestos aislados de extractos de plantas, pero este trastorno psiquiátrico ha progresado significativamente.<sup>30</sup>



**Fig. 6** Neurotransmisores y su relación con la ansiedad, depresión y agresividad.


El ácido oleanólico y el ácido ursólico han mostrado alrededor de 120 actividades biológicas, destacando varias actividades farmacológicas prometedoras, como sus efectos hepatoprotectores y sus actividades antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena, cardiotónica, sedante y efectos tónicos, etc.<sup>31</sup> Una de las propiedades farmacológicas importantes atribuidas al ácido ursólico es su efecto sedante. Se ha demostrado que es capaz

de producir un efecto depresivo significativo en el SNC al reducir la actividad motora espontánea, y el número y letalidad de las convulsiones inducidas por pentilentetrazol (PTZ).<sup>32</sup> Cornejo Garrido y su grupo de investigación determinaron la toxicidad aguda y subaguda (28 días) de una mezcla de ácido ursólico y oleanólico obtenido de *Bouvardia ternifolia* en ratones. Los resultados mostraron una LD<sub>50</sub> > 300 mg/kg de la mezcla UA/OA en ambos sexos de ratones. A esta dosis no se registraron muertes ni signos de toxicidad durante el período de observación de 14 días. Con respecto al análisis subagudo, no se presentaron signos de toxicidad o mortalidad en los grupos tratados, en comparación con los grupos de control. En consecuencia, la administración a 28 días de la mezcla de UA/OA, en una dosis de 13 mg/kg, no provocó ninguna alteración hematológica. Durante la administración subaguda, no hubo muerte de animales, tampoco se observaron alteraciones en su crecimiento, ni alteraciones en el peso de los diferentes órganos. Los estudios de biometría hemática y química sanguínea mostraron niveles normales en todos los parámetros evaluados. Los análisis histopatológicos de los principales órganos no presentaron cambios o anomalías.

Por otro lado, Machado en 2012 investigó el efecto antidepresivo del ácido ursólico aislado de *Rosmarinus officinalis L.* en dos pruebas antidepresivas, la prueba de suspensión de cola (TST) y la prueba de natación forzada (FST) en ratón. Los resultados mostraron una respuesta significativa de tipo antidepresivo tanto en TST como en FST, indicando que el sistema dopaminérgico está implicado en la acción antidepresiva del ácido ursólico en la TST.<sup>33</sup>

En el año 2014, Colla y sus colaboradores determinaron los sistemas serotoninérgicos y noradrenérgicos implicados en el efecto antidepresivo del ácido ursólico, utilizando la prueba de suspensión por la cola (TST), prueba de natación forzada, y dos pruebas de comportamiento diferentes para detectar los efectos antidepresivos de los compuestos. Los resultados de este estudio muestran una implicación de los sistemas serotoninérgicos y noradrenérgicos, pero no de los sistemas glutamatérgicos u opioides, en el efecto antidepresivo del AU en la TST.<sup>34</sup>

Un año más tarde Colla investigó los efectos ansiolíticos del ácido ursólico en diferentes paradigmas de comportamiento que evalúan la ansiedad en ratones: prueba de campo abierto, prueba de laberinto elevado, prueba de caja clara/oscura y prueba de mármol. Los resultados demuestran que la administración aguda de ácido ursólico (10 mg/kg) produjo efecto ansiolítico



en la prueba de campo abierto y de laberinto elevado, menciona también que la dosis ansiolítica efectiva es la misma que presenta otros efectos neurofarmacológicos como el antidepresivo en la prueba de natación forzada, así como propiedades antioxidantes y antiinflamatorias en ratones<sup>35</sup>



## 3.- JUSTIFICACIÓN

### 3. Justificación

Considerando que la familia *Rubiaceae* es la cuarta más grande entre las fanerógamas y que a pesar de ello existen muy pocos reportes sobre la composición química del género *Nernstia*, el estudio químico de su única especie resulta de suma importancia para establecer su perfil metabólico. Por otra parte, la ansiedad es un padecimiento catalogado entre las enfermedades mentales menores, que sin embargo aquejan a cerca del 40% de la población mundial. Su incidencia afecta las relaciones familiares, de trabajo y sociales en general de los individuos que las padecen, por lo que es necesaria su atención para su sano desarrollo. El estudio de los compuestos aislados de *Nernstia mexicana*, planta utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de la ansiedad puede conducir al descubrimiento de productos naturales con esta actividad tranquilizante y sedante, útiles en la terapia médica.



## 4.-HIPÓTESIS

#### 4. Hipótesis

*Nernstia mexicana* es utilizada por la población de los estados de la región central de México para el tratamiento de la ansiedad, por lo que debe tener acción sobre el Sistema Nervioso Central. Sus extractos y algunos de los compuestos contenidos en los mismos deben tener esta misma propiedad, la cual puede ser asociada con las actividades tranquilizante y sedante. Por ello, sus extractos y algunos de sus compuestos puros presentaran alguna de estas actividades o ambas.



## 5.- OBJETIVOS

## 5.1 Objetivo general:

Aislar, purificar y caracterizar los metabolitos secundarios de los extractos de acetona y metanol de las partes aéreas de *Nernstia mexicana* y asociarlos a su actividad sedante y tranquilizante.

## 5.2 Objetivos específicos.

- ❖ Obtener los extractos de metanol y acetona de las partes aéreas de *Nernstia mexicana*.
- ❖ Evaluar la actividad sedante y tranquilizante de estos extractos.
- ❖ Realizar el aislamiento, purificación y caracterización de los metabolitos presentes en ambos extractos.
- ❖ Evaluar estos compuestos y asociarlos con la actividad sedante y tranquilizante de esta planta.



## 6.-METODOLOGÍA

## 6. Metodología

### 6.1 Obtención del material

Las partes aéreas de *Nernstia mexicana* fueron recolectadas en el Valle del Mezquital Hidalgo por el M. en C. Ramiro Ríos Gómez, profesor de la Facultad de Estudios superiores Zaragoza de la UNAM. Un ejemplar de ésta fue depositado en el Herbario de la misma facultad (FEZA) con número FEZA-15059.

### 6.2 Obtención de los extractos

El material recolectado de *Nernstia mexicana* se dejó secar a temperatura ambiente y a la sombra. Una vez seco fue triturado, obteniéndose 1.7013 kg para llevar a cabo su maceración en 4 L de acetona y metanol, respectivamente, durante 72 h en tres ocasiones para cada disolvente. El extracto se recuperó por destilación a presión reducida a 56 y 65 C°, respectivamente. Al término de este proceso se recuperaron 211.3 g de extracto acetónico, lo que corresponde a un rendimiento de 12.41%, mientras que para el extracto metanólico se obtuvieron 511.6 g y un rendimiento de 30.06%. El rendimiento total fue del 42.47%. Del extracto acetónico se obtuvo un sólido de color café, el cual fue filtrado y lavado con acetona fría, hasta obtener un sólido color amarillo (50.62g, 2.97%).

### 6.3 Procedimiento general

El proceso cromatográfico se llevó a cabo en Cromatografía en Columna Abierta (CCA) utilizando gel de sílice *flash* (*mesch* 230:400) como fase estacionaria. Como seguimiento del desarrollo de la CCA se realizó Cromatografía en Capa Fina (CCF), utilizando placas de base de aluminio que soportan como fase estacionaria gel de sílice, utilizando para su visualización una lámpara de UV modelo UVGL-25 a 234 y 336 nm. Posteriormente, se utilizó sulfato cérico amoniacal  $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)]$  al 1% en ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 2N con calentamiento como revelador. Para la elucidación estructural se hizo uso de los equipos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) Varian Mercury de 200 y 400 MHz, Bucker Avance de 500 MHz en disolventes deuterados como cloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ), acetona ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) y metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

Para el análisis de los extractos mediante cromatografía de gases se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 6890 plus, acoplado a un espectrometro de masas: 5973 N mediante técnica de ionización por impacto electrónico eV con el siguiente programa de temperaturas : una rampa de 2°C por cada minuto iniciando en una temperatura de 50° C y concluyendo en 285 °C a los 20 minutos en modo splitless.

### 6.3.1 Separación cromatográfica de los constituyentes químicos del extracto acetónico de las partes aéreas de *Nerstia mexicana*.

1 g del solido amarillo obtenido mediante lavados de acetona se absorbieron en 0.5 g de gel de sílice y fueron empacados en una columna cromatográfica de 30 mm de diámetro y 8 pulgadas con gel de sílice *flash* suspendida en un sistema *n*-hexano-AcOEt (90:10). Con este mismo sistema se inició esta cromatografía. Se recolectaron fracciones de 20 mL. Se realizaron incrementos en la polaridad de la fase móvil, adicionando AcOEt cuando el monitoreo por CCF lo indicaba.

Un resumen de este primer proceso cromatográfico se observa en la tabla 1:

<b>Tabla 1. Proceso cromatográfico del extracto acetónico</b>		
<b>Reunión</b>	<b>Fracciones</b>	<b>Sistema de elusión</b>
A	1-5	90:10 nHex-AcOEt
B	6-7	90:10 nHex-AcOEt
C	8-17	90:10 nHex-AcOEt
D	18-46	80:20 nHex-AcOEt
E	47-60	80:20 nHex-AcOEt
F	60-61	80:20 nHex-AcOEt
G	62-95	70:30 nHex-AcOEt
H	95-100	70:30 nHex-AcOEt
I	100-127	70:30 nHex-AcOEt
J	127-139	60:40 nHex-AcOEt
K	140-164	60:40 nHex-AcOEt
L	165	100 % AcOEt
M	166	100 % MeOH

De este proceso cromatográfico se logró la obtención de un sólido blanco, aparentemente puro, que se identificó como ácido ursólico mediante la interpretación de sus espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  y DEPT, estos datos fueron comparados con los reportados en la literatura para poder establecer la estructura. Cabe mencionar que en todas las reuniones se identificó ácido ursólico en diferentes grados de pureza. Los datos espectroscópicos de este compuestos se enlistan a continuación.

RMN  $^1\text{H}$  (Piridina- $d_5$ , 500 MHz, espectro 1),  $\delta$  (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento, asignación) 3.44 (1 H  $\alpha$ , dd); 1.96 (2 H); 5.49 (1H, s); 2.19 (1H,  $\beta$ ); 2.12 (1 H, tr) 3.30 (1 H,  $\beta$ ,dd).

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz, espectro): 39.4 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_1$ ); 28.1 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_2$ ); 78.5 (CH,  $\text{C}_3$ ), 39.8 (C,  $\text{C}_4$ ); 56.2 (CH,  $\text{C}_5$ ); 19.1 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_6$ ); 33.4 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_7$ ); 40.3 (C,  $\text{C}_8$ ); 48.4 (CH,  $\text{C}_9$ ), 37.6 (C,  $\text{C}_{10}$ ); 24 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_{11}$ ); 126 (CH,  $\text{C}_{12}$ ); 139.6 (C,  $\text{C}_{13}$ ); 42.8 (C,  $\text{C}_{14}$ ); 29 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_{15}$ ); 25.3 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_{16}$ ); 48.1 (C,  $\text{C}_{17}$ ); 53.9 (CH,  $\text{C}_{18}$ ); 39.7 (CH,  $\text{C}_{19}$ ); 39.7 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_{20}$ ); 31.4 (C,  $\text{C}_{21}$ ); 37.8 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_{22}$ ); 29.2 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_{23}$ ); 16 (CH,  $\text{C}_{24}$ ); 16.9 (CH,  $\text{C}_{25}$ ); 17.8 (CH,  $\text{C}_{26}$ ), 24.3 (CH,  $\text{C}_{27}$ ); 180 (C,  $\text{C}_{28}$ ); 17.9 (CH,  $\text{C}_{29}$ ); 21.7 (CH,  $\text{C}_{30}$ ).

### **6.3.2 Purificación de los lavados del extracto acetónico (Cromatografía en cartuchos superempacados)**

De los lavados obtenidos del extracto acetónico se tomó un 1 g y se disolvió en 6 ml de *n*-Hexano. La solución obtenida se colocó en un cartucho previamente activado. Este proceso cromatográfico se empezó a eluir con un sistema 95:5 *n*-hexano-AcOEt, recolectando cargas de 6 ml. Cada sistema se repitió 4 veces y se incrementó la polaridad de la fase móvil adicionando AcOEt hasta llegar a un sistema 50:50 *n*-hexano-AcOEt, al término de este proceso se obtuvieron 40 fracciones. Resultado de ello, se logró purificar un compuesto blanco, que fue identificado como ácido ursólico, el cual ya había sido previamente purificado. Con la finalidad de obtener una mayor cantidad de la reunión  $\text{A}^1$  se repitió el proceso 5 veces.

Resumen del proceso de cromatografía en cartuchos superempacados:

Reunión	Fracción	Sistema de elusión
A <sup>1</sup>	1-5	95:5 n-Hex-AcOEt
B <sup>2</sup>	6-40	90:10 n-Hex-AcOEt 85:15 n-Hex-AcOEt 75:25 n-Hex-AcOEt 70:20 n-Hex-AcOEt 65:35 n-Hex-AcOEt 60:40 n-Hex-AcOEt 55:45 n-Hex-AcOEt 50:50 n-Hex-AcOEt

### 6.3.3 Recromatografía de la reunión A<sup>1</sup> de las aguas madres del extracto acetónico

De la reunión A<sup>1</sup> se obtuvieron 0.45 g, se adsorbieron en 0.20 g de gel de sílice y se empacaron en una columna de 2 cm de diámetro con 7 pulgadas de gel sílice *flash*, suspendidas en un sistema *n*-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 7:3, con el cual se llevó a cabo la CCA. Se recolectaron 116 fracciones de 25 ml. De esta cromatografía se lograron purificar 3 compuestos, •-sitoesterol, triacilglicéridos, poliprenoles,  $\alpha$ -tocoferol.

#### Triacilglicéridos

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz, espectro 3):  $\delta$  (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento, asignación); 5.34 (8H, dt,  $J=6.0$  MHz H<sub>a</sub>); 5.37 (1H, m, H<sub>a'</sub>); 4.34 (2H, dd,  $J=12.18$  4.5 Hz H<sub>2b</sub> H<sub>3b</sub>); 4.12 (2H, dd,  $J=12.03$ , 6.0 Hz H<sub>2c</sub>, H<sub>3c</sub>); 2.80 (4H, t,  $J=4.8$  Hz H<sub>d</sub>); 2.31 (6H, t,  $J=2.81$  Hz H<sub>e</sub>);  $\delta$  1.60 (6H, m, H<sub>g</sub>);  $\delta$  0.88 (9H, s, H<sub>i</sub>).

#### Poliprenoles

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz, espectro 4):  $\delta$  (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento, asignación); 5.37 (1H, tc, 7.2, 1.5 Hz H<sub>2</sub>); 3.98 (2H, d,  $J=7.2$ , H<sub>1</sub>); 0.80 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H<sub>8</sub>); 1.67 (3H, d,  $J=1.5$  MHz H<sub>30</sub>); 1.30 (28 H, s, CH<sub>2</sub>); 1.59-1.00 (5H, M, H<sub>7</sub>, H<sub>11</sub> H<sub>15</sub>, H<sub>19</sub>, H<sub>23</sub>); 0.80 (9H, d,  $J=6.6$  MHz, H<sub>24</sub>, H<sub>25</sub>, H<sub>26</sub>, H<sub>27</sub>).

#### $\alpha$ -Tocoferol

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz, espectro 4):  $\delta$  (integración, multiplicidad, constante de acoplamiento, asignación); 4.2 (1H, s), 2.6 (2H, t,  $J=7.4$  Hz,  $\text{H}_4$ ); 2.2 (3 H, s,  $\text{H}_{24}$ ); 2.1 (6H, s,  $\text{H}_{24-25}$ ); 1.8 (2H, m,  $J=7$  Hz  $\text{H}_3$ ); 1.2 (3 H, s,  $\text{H}_{27}$ ); 0.9 (3H, d,  $J=6.4$  Hz  $\text{H}_{30}$ ); 0.80 (3H d,  $J=6.4$  Hz).

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz, espectro): 145.7 (C,  $\text{C}_9$ ); 144.7 (C,  $\text{C}_6$ ); 122.7 (C,  $\text{C}_8$ ); 121.2 (C,  $\text{C}_{25}$ ); 118.7 (C,  $\text{C}_7$ ); 117.5 (C,  $\text{C}_{10}$ ); 74.7 (C,  $\text{C}_2$ ); 39.9 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_{11}$ ); 39.5 ( $\text{CH}_2$ ), 37.6( $\text{CH}_2$ ); 37.4 ( $\text{CH}_2$ ); 32.9 (CH); 32.8 (CH); 31.7 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_3$ ); 29.8 ( $\text{CH}_2$ ); 28.1 (CH,  $\text{C}_{22}$ ); 24.9 ( $\text{CH}_2$ ); 24.6 ( $\text{CH}_2$ ); 23.9 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_{30}$ ); 22.9 ( $\text{CH}_3$ ); 22.8 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_{30}$ ); 21.2 ( $\text{CH}_2$ ); 20.9 ( $\text{CH}_2$ ); 19.9 ( $\text{CH}_3$ ); 19.8 ( $\text{CH}_3$ ); 12.4 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_{25}$ ) 11.5 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_{26}$ ).

#### **6.3.4 Separación cromatográfica de los constituyentes químicos del extracto metanólico de las partes aéreas de *Nerstia mexicana*.**

El primer fraccionamiento del extracto metanólico se llevó a cabo mediante la técnica de percolación. Para ello se utilizó un embudo bucher de porcelana de 27.5 cm de diámetro interno. 250 g de extracto fueron absorbidos en 200 g de gel de sílice *flash*. Se inicio este proceso con un sistema de elusión 90:10 *n*-hexano-AcOEt aumentando la polaridad hasta llegar a un sistema 70:30 *n*-hexano-AcOEt. Posteriormente se cambió a un sistema 90:10  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -AcOEt. Se realizaron incrementos en la polaridad de la fase móvil, adicionando AcOEt cuando el monitoreo por CCF lo indicaba.

Se obtuvieron 53 fracciones en total, cada una de 1000 ml. De acuerdo con la homogeneidad observada en CCF, las fracciones fueron reunidas en 6 grupos.

#### **6.3.5 Acetilación de los extractos acetónico y metanólico**

30 mg de los extractos metanólico y acetónico se pesaron en un vial. A cada uno de ellos se les adicionaron 6 ml de anhídrido acético y un 1 mililitro de piridina. La mezcla se dejó en agitación durante 72 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se añadieron al seno de la reacción 6 ml de agua y la reacción se dejó en agitación durante 10 minutos. Una vez transcurrido este lapso de tiempo, la mezcla se extrajo con diclorometano, conservando la fase orgánica, misma que se extrajo con HCl al 5 % y finalmente lavándola con solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . La fase orgánica obtenidas de las extracciones se seca con sulfato de

sodio anhidro y se recupera por destilación a presión reducida a 40 °C. No se indica que pasó con estos productos de acetilación. Los análisis de cromatografía de gases acoplado a masas no hablan de los productos acetilados

## 6.4 Evaluaciones neurofarmacológicas

### 6.4.1 Animales

Se usaron ratones hembra de la cepa *Swiss webster* (25-30 g), los cuales tuvieron libre acceso al agua y alimento. Todas las pruebas fueron realizadas siguiendo las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Los animales estuvieron en ambientación al menos 5 días previos al experimento a 26°C. Se trabajo con grupos experimentales de 6 animales, todos los animales fueron utilizados una sola vez y al finalizar la prueba éstos fueron sacrificados.

### 6.4.2 Fármacos y reactivos

Los extractos acetónico y metanólico fueron obtenidos mediante la maceración de las partes aéreas de *Nerstia mexicana*, los extractos se disolvieron en solución salina (0.9%) y Tween 80. Los compuestos de prueba se administraron por vía oral, 0.2 mL /10 g de peso del ratón) y el fármaco de referencia por vía intraperitoneal (0.1 mL / 10 g de peso del ratón). Los reactivos utilizados para la evaluación neurofarmacología se enlistan en la tabla 1.

Reactivo	Marca	Grado	% Pureza	CAS
Pentilentetrazol	Aldrich	Reactivo	-----	54-95-5
Diazepam	Bayer	Comercial	-----	
Solución salina	CS PISA	Comercial	NaCl 0.9	7647-14-5
Pentobarbital sódico	Penta-Hypnol	Comercial	-----	76-74-4 57-33-0
Tween 80	Aldrich	Comercial	Ácido oleico > 58.0	9005-65-60

### 6.4.3 Diseño experimental

El experimento se dividió en dos secciones, en la primera se realizó un perfil neurofarmacológico que consiste en pruebas de coordinación motora, sedación y efecto anti-ansiedad, además de una evaluación del efecto anticonvulsivo. En la segunda sección se evaluó el efecto de potenciación de la actividad sedante hipnótica inducida por pentobarbital (Déciga-Campos et al., 2016). En cada sección se formaron 8 grupos de animales y cada sección fue organizada de la siguiente manera:

**Sección de experimentos 1:** Se formaron 8 grupos de 6 ratones, al primer grupo se le administró el vehículo (solución salina 0.9% y Tween 80) en donde se homogenizaron los extractos, el segundo grupo se administró con diazepam (3 mg/kg, i.p.) y se consideró como grupo de referencia positivo. Tres grupos fueron administrados con el extracto metanólico (100, 300, y 1000 mg/kg, p.o.)- y otros 3 con extracto acetónico (100, 300, y 1000 mg/kg, p.o.).

Una vez que los diferentes grupos de animales fueron administrados con los tratamientos (vehículo, diazepam o extractos) se dejaron 20 minutos de absorción para iniciar la evaluación neurofarmacológica, la cual consistió en colocar a los ratones en una caja exploratoria, después se pasó a un tablero perforado, posteriormente a un cilindro y finalmente a un plus maze de cuatro brazos (Déciga-Campos et al., 2016). Al terminar estas pruebas a éstos mismos animales se les administró pentilentetrazol, un fármaco que induce convulsiones. A continuación, se detallan cada una de estas pruebas.

**Sección de experimentos 2:** Se formaron 8 grupos de 6 ratones, al primer grupo se le administró el vehículo (solución salina 0.9% y Tween 80) en donde se homogenizaron los extractos, el segundo grupo se le administró diazepam (3 mg/kg, i.p.) y se consideró como grupo de referencia. Tres grupos fueron administrados con el extracto metanólico (100, 300, y 1000 mg/kg, p.o.)- y otros 3 con extracto acetónico (100, 300, y 1000 mg/kg, p.o.).

Una vez que los diferentes grupos de animales fueron administrados con los tratamientos (vehículo, diazepam o extractos) se dejaron 20 minutos de absorción para iniciar la evaluación con pentobarbital.

#### **6.4.3.1 Prueba de campo abierto**

La prueba se realizó colocando al ratón en una caja de acrílico dividida en 9 cuadrantes (9 cm x 5.5 cm). Se registró el número de cuadrantes que el ratón explora, y el número de veces que levanta sus patas delanteras en un periodo 2 minutos.



**Fig.7** Prueba de campo abierto para determinar la actividad exploratoria del ratón en un espacio amplio

#### 6.4.3.2 Prueba de tablero perforado

Inmediatamente después de la prueba anterior el ratón se colocó en el centro del tablero perforado que consta de 9 orificios de 2 cm de diámetro ubicados de manera equidistante. El número de veces que incline la cabeza (*head-dips*) hasta la altura de las orejas se registró durante 3 minutos.



**Fig.8** Prueba de campo abierto para determinar la actividad exploratoria del ratón en un espacio sin límites.

#### 6.4.3.3 Prueba del cilindro de exploración

Después del tablero perforado se pasa al ratón a un cilindro de acrílico (16 cm de altura, 11 cm de diámetro) y se cuantificó el número de levantamientos sobre los miembros posteriores durante 5 min.



**Fig.9** Prueba de campo abierto para determinar la actividad exploratoria del ratón en un espacio reducido

#### **6.4.3.4 Prueba de laberinto elevado**

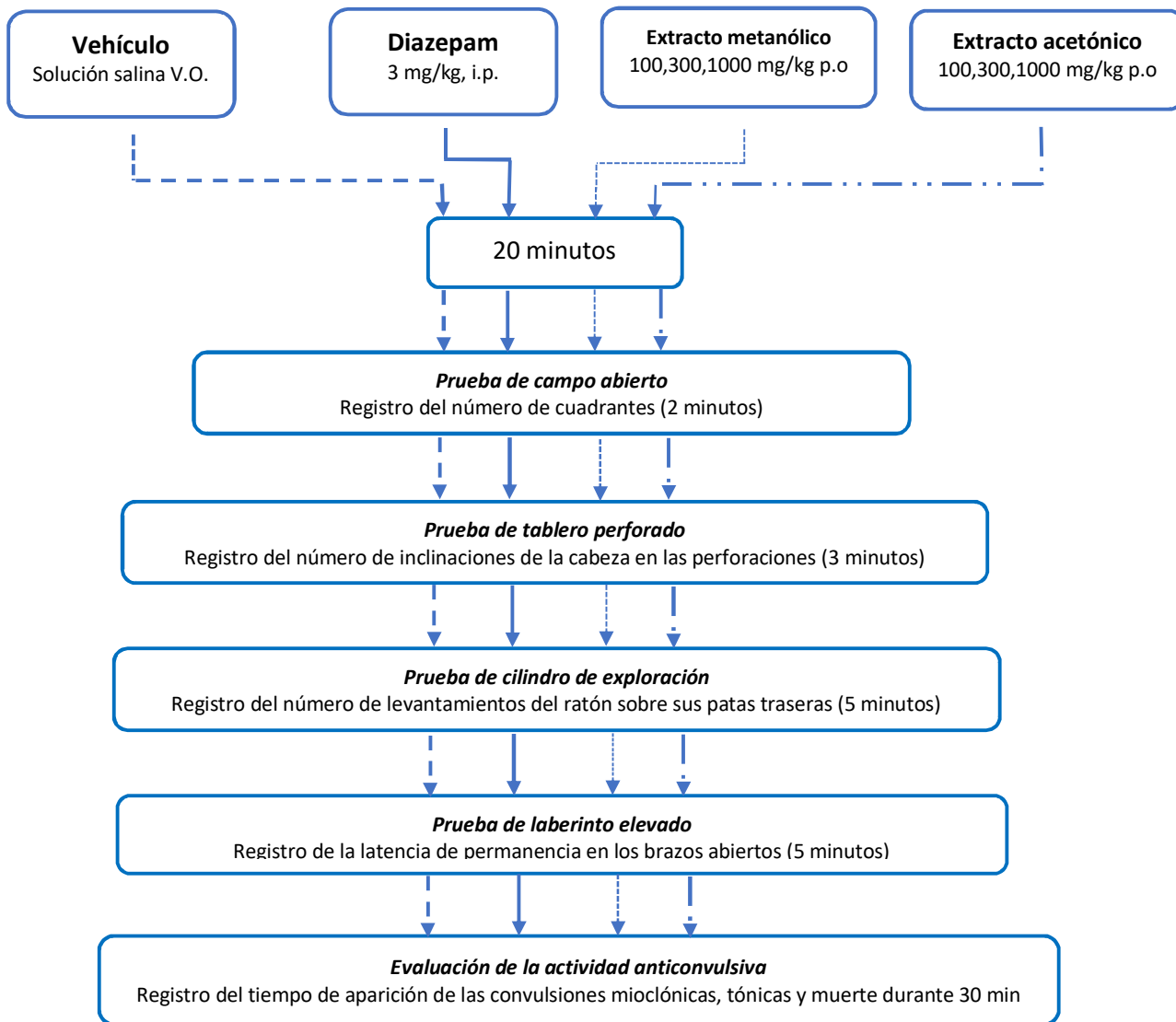
Al finalizar el tiempo en el cilindro los ratones se colocaron en el centro de un plus maze de 4 brazos, dos espacios abiertos y dos cerrados de 27.5 cm cada uno a una altura de 40 cm del piso.-Se registró el tiempo que el animal permaneció en el espacio abierto en un periodo de 5 minutos.



**Fig.10** Prueba de plus maze de 4 brazos para determinar actividad en un espacio abierto

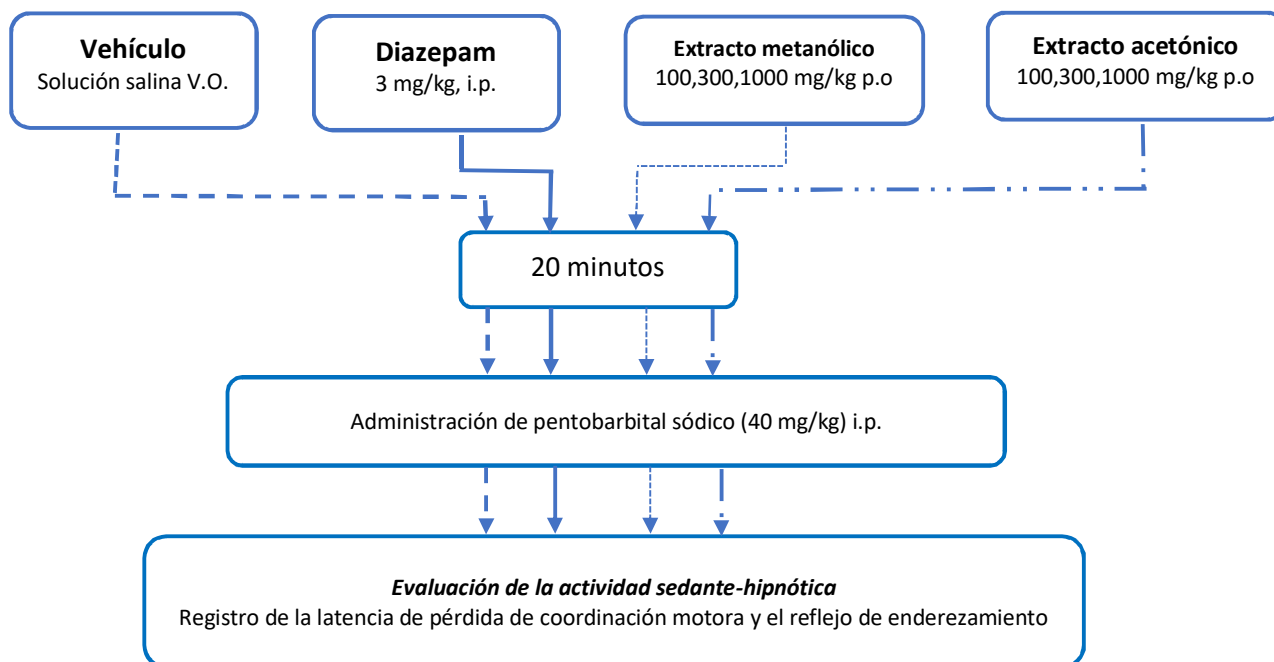
#### **6.4.3.5 Evaluación de la actividad anticonvulsiva.**

Una vez que los ratones pasaron por todas las pruebas de espacio se administró PTZ a una dosis de 80 mg/kg i.p. para inducir convulsiones. Se registró latencia de aparición de las convulsiones mioclónicas, clónicas y tónicas, durante 30 min, se consideró este tiempo de corte ya que con diazepam es el tiempo que en promedio previenen el efecto convulsivo del PTZ.



#### 6.4.3.6 Evaluación de la actividad sedante-hipnótica

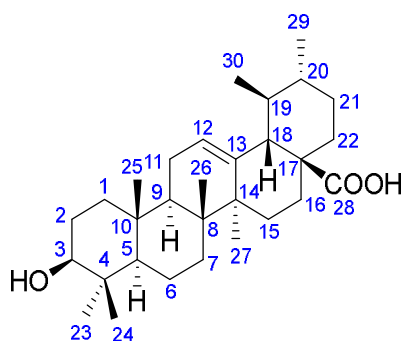
Se formaron 8 grupos de 6 ratones, al primer grupo se le administró el vehículo (solución salina 0.9% y Tween 80) en donde se homogenizaron los extractos, el segundo grupo se le administró diazepam (3 mg/kg, i.p.) y se consideró como grupo con fármaco de referencia. Tres grupos fueron administrados con el extracto metanólico (100, 300, y 1000 mg/kg, p.o.)- y otros 3 con extracto acetónico (100, 300, y 1000 mg/kg, p.o.). Una vez que los animales fueron administrados se dejaron 20 minutos y se les administró pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg i.p. y se registró la latencia de la pérdida de coordinación motora (fase sedante), la pérdida de reflejo de enderezamiento (la hipnosis) y la duración de la hipnosis.





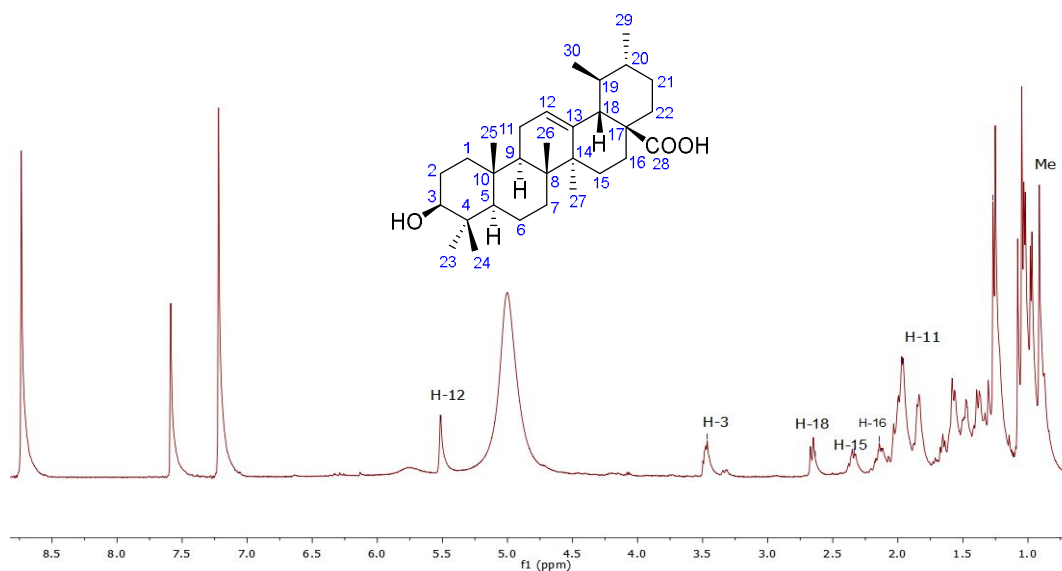
## 7.-DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 7.1.1 Acido ursólico



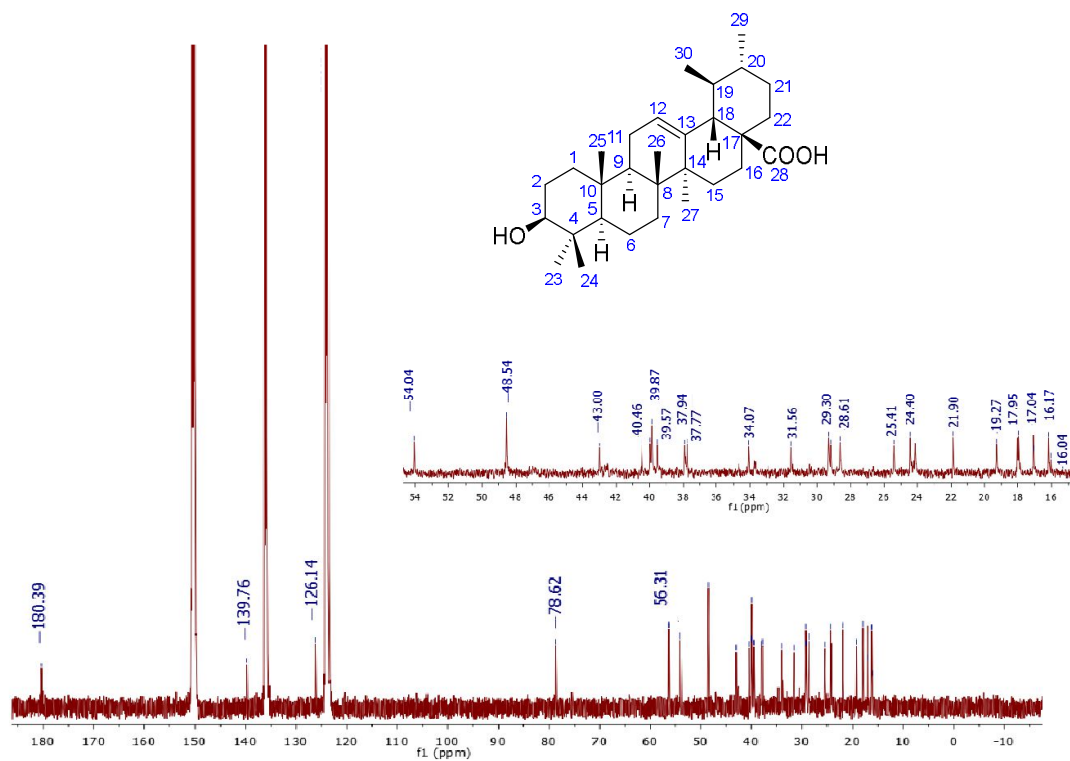
De la recromatografía de la fracción A<sup>1</sup> del extracto acetónico se logró identificar un sólido blanco soluble en piridina. Este compuesto se identificó mediante la comparación de sus datos espectroscópicos con los reportados en la literatura.<sup>36</sup> A continuación, se describen las principales señales clave para la elucidación estructural del compuesto.

En el espectro de RMN <sup>13</sup>C (**Fig. 11**) se identifican 30 señales. Por el número de carbonos se propone que se trata de un triterpeno. Nueve señales son características de metilenos:  $\delta$  39.5, 28.6, 19.2, 34.0, 29.0, 25.3, 31.4, 37.8, y 24.0. Dos carbonos adicionales, un metino en  $\delta$ 126.0 ( con su protón vinílico en  $\delta$ 5.49 ), y un carbono cuaternario en  $\delta$ 139.6 pertenecen a la zona de carbonos sp<sup>2</sup>. Y describen la presencia de un doble enlace trisustituido. Un carbono con desplazamiento en  $\delta$ 180.2 corresponde a un carbonilo de ácido carboxílico. Los cinco carbonos cuaternarios se encuentran desplazados en  $\delta$ 39.8, 40.3, 37.6, 42.8, 48.4. Finalmente, también se observan 6 señales en el rango de  $\delta$ 39.7 a 78.5, pertenecientes a metinos, en el último de los cuales se ubica, por desplazamiento químico, un grupo alcohol (desplazamiento base de oxígeno). Por último, por desplazamiento químico en  $\delta$ 16.0, 16.9, 17.8, 17.9, 21.7, 24.3 y 29.2, estas siete señales pertenecen a los grupos metilos del triterpeno.

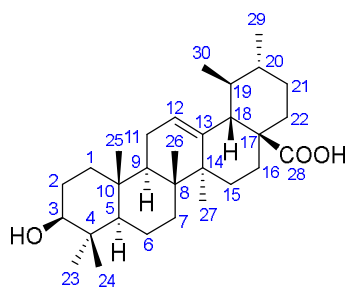


**Fig. 11** RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, Piridina-d<sub>5</sub>) fragmento del espectro (1) del ácido ursólico (67)

En el espectro de RMN <sup>13</sup>C presento las 30 señaladas esperadas. La comparación de todos los datos obtenidos para este metabolito con los reportados en la literatura (tabla nos permito corroborar su estructura identificándolo como acido ursólico.



**Fig. 12** RMN<sup>13</sup>C (500 MHz, Piridina) fragmento del espectro (2) del ácido ursólico (67)



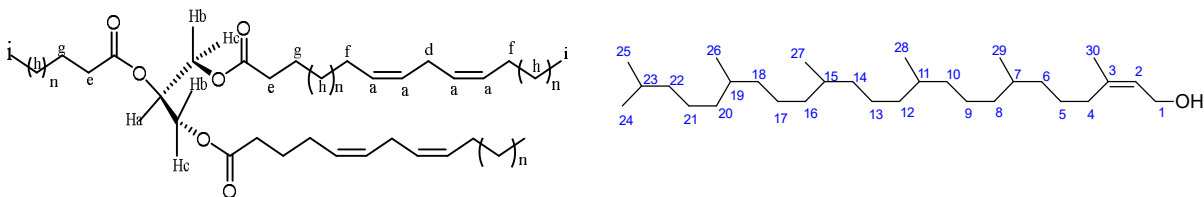
**Tabla 4. Comparación de datos de  $^1\text{H}$  del ácido ursólico.<sup>36</sup>**

Compuesto $^1\text{H}$	Reportado $^1\text{H}$
3.47 (1H, dd)	3.44 (1H, dd)
1.96 (2H)	1.96 (2H)
5.51 (1H, s)	5.49 (1H, s)
2.33 (1H, $\beta$ )	2.19 (1H, $\beta$ )
2.12 (1H, tr)	2.12 (1H, tr)
2.66 (1H, dd)	3.30 (1H, $\beta$ dd)

**Tabla 5. Comparación de datos de  $^{13}\text{C}$  del ácido ursólico.<sup>36</sup>**

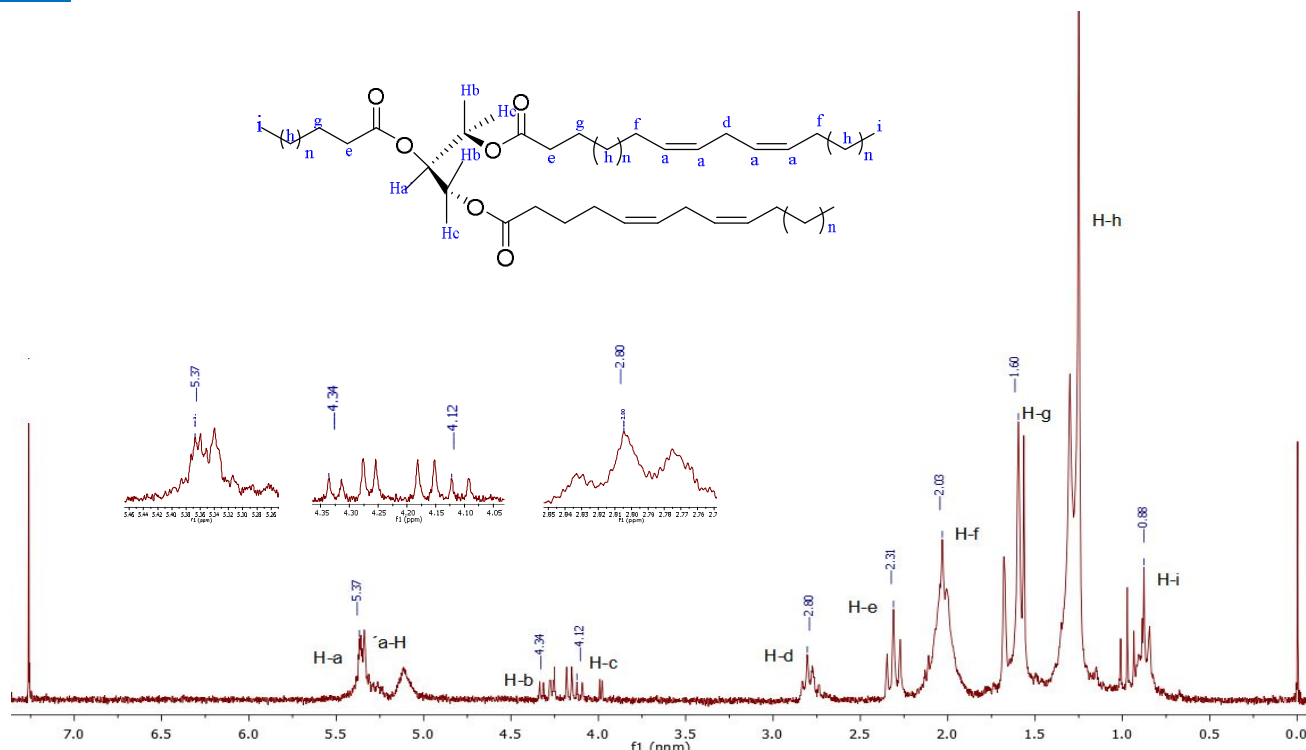
Reportado		Compuesto
$^{\circ}\text{N}$	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$
1	39.2	39.5 CH <sub>2</sub>
2	28.2	28.6 CH <sub>2</sub>
3	78.2	78.5 CH
4	39.6	39.8 C
5	55.9	56.2 CH
6	18.8	19.2 CH <sub>2</sub>
7	33.7	34.0 CH <sub>2</sub>
8	40.1	40.3 C
9	48.1	48.4 CH
10	37.5	37.6 C
11	23.7	24.0 CH <sub>2</sub>
12	125.7	126.0 CH
13	139.3	139.6 C
14	42.6	42.8 C
15	28.8	29.0 CH <sub>2</sub>
16	25.0	25.3 CH <sub>2</sub>
17	48.1	48.4 C
18	53.6	53.9 CH
19	39.5	39.7 CH
20	39.4	39.7 CH
21	31.1	31.4 CH <sub>2</sub>
22	37.4	37.8 CH <sub>2</sub>
23	28.8	29.2 CH <sub>3</sub>
24	16.5	16.0 CH <sub>3</sub>
25	15.7	16.9 CH <sub>3</sub>
26	17.5	17.8 CH <sub>3</sub>
27	24	24.3 CH <sub>3</sub>
28	179.7	180.2 C
29	17.5	17.9 CH <sub>3</sub>
30	21.4	21.7 CH <sub>3</sub>

## 7.1.2 Triacilglicéridos y poliprenoles



La mezcla de triacilglicéridos y poliprenoles fue identificada mediante RMN. Su aislamiento se logró a través de la recromatografía de la reunión A<sup>1</sup> de las aguas madres del extracto acetónico, mediante una cromatografía en columna abierta eluída con un sistema 7:3 *n*-hexano-diclorometano.

Los protones de tipo vinílico fueron deducidos por una señal múltiple en  $\delta$ 5.37-5.34 (Ha) (**fig. 13**) que integra para 11 protones que corresponden a 10 hidrógenos vinílicos (cinco dobles enlace) y un protón (Ha') perteneciente al C1 del fragmento del glicerol. En  $\delta$ 4.34 (2H, dd, J=12.2 Hz, H<sub>2b</sub>, H<sub>3b</sub>) y 4.12 (2H, dd, J=12.0 Hz, H<sub>2c</sub>, H<sub>3c</sub>) se observan dos dobles de doble, con integración de 2 protones, dado su desplazamiento químico, indican la presencia de cuatro hidrógenos vecinos a oxígenos. Los protones doblemente alílicos (H<sub>d</sub>) presentan una señal triple que integra para cuatro protones en 2.80 ppm. La señal en 2.03 (m, H<sub>f</sub>) evidencia la presencia de doce protones alílicos de acuerdo a su integración, mientras que las señales en los rangos de  $\delta$ 2.31 (m, H<sub>e</sub>) y 1.60 (m, H<sub>g</sub>) pertenecen a protones  $\alpha$  y  $\beta$  a un carbonilo, respectivamente. Estas señales integran para seis protones cada una, indicando la presencia de residuos de ácido graso. La integración para seis protones de la señal debida a metilos  $\delta$ 0.88 indica una naturaleza lineal.



**Fig. 13** RMN $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) fragmento del espectro (3) del triacilglicérido

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la misma fracción se pudo observar la presencia de un segundo compuesto. En él es posible distinguir la presencia de una señal triple de cuartetos en  $\delta$ 5.37 que integra para un protón vinílico, la multiplicidad de esta señal indica que tiene como vecinos a un metilo y a un metileno. Una señal doble en  $\delta$ 3.98 corresponde por desplazamiento químico a un metileno alílico y base de oxígeno. Así mismo, se puede observar una señal doblete en  $\delta$ 0.80 que corresponde a metilos. La combinación de los fragmentos descritos anteriormente y su comparación con datos espectroscópicos reportados en la literatura permiten proponer que este compuesto corresponde a un poliprenol.

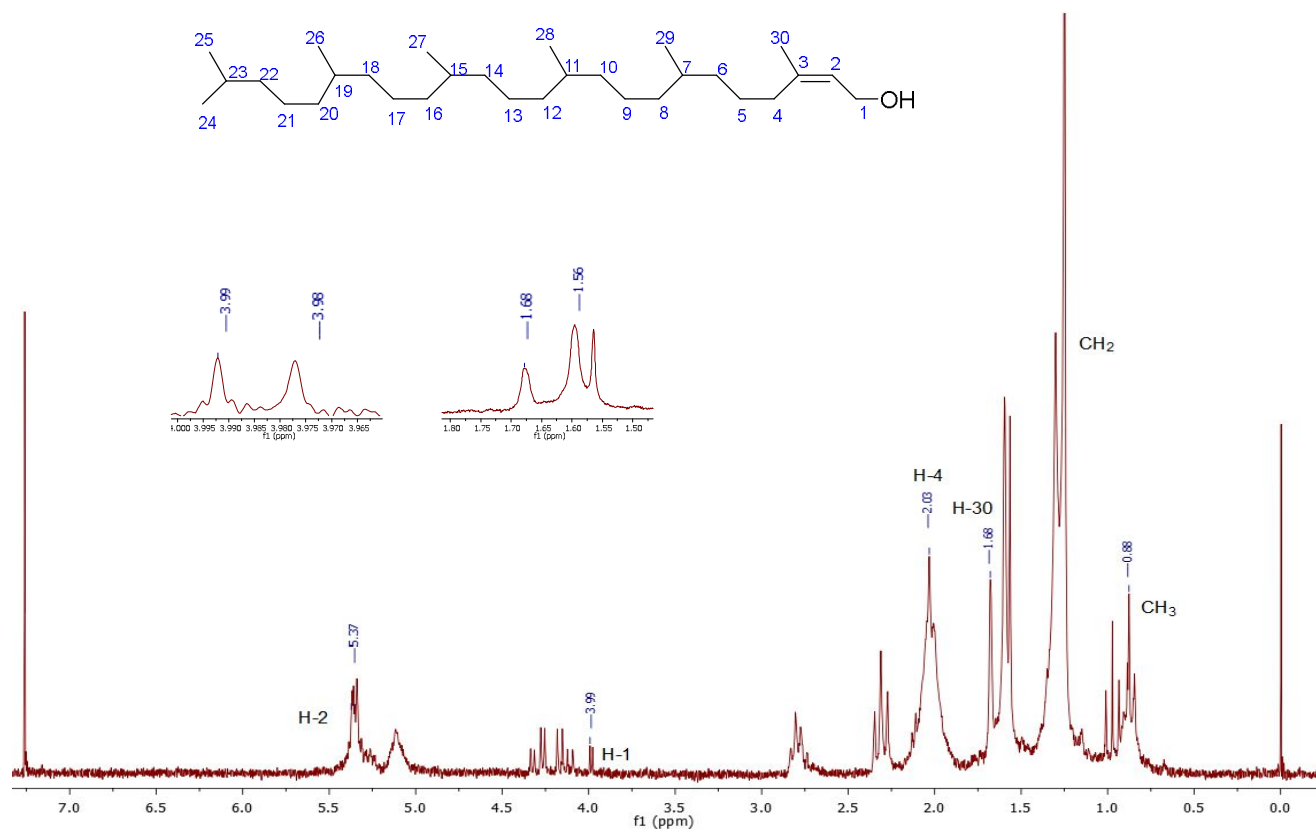
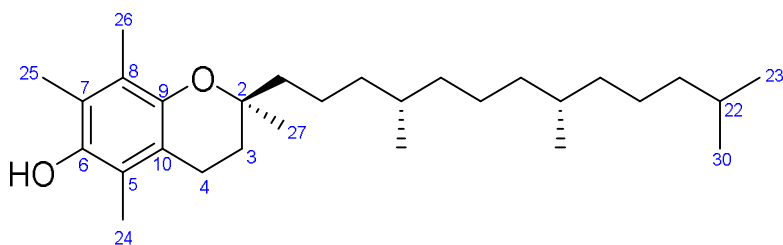


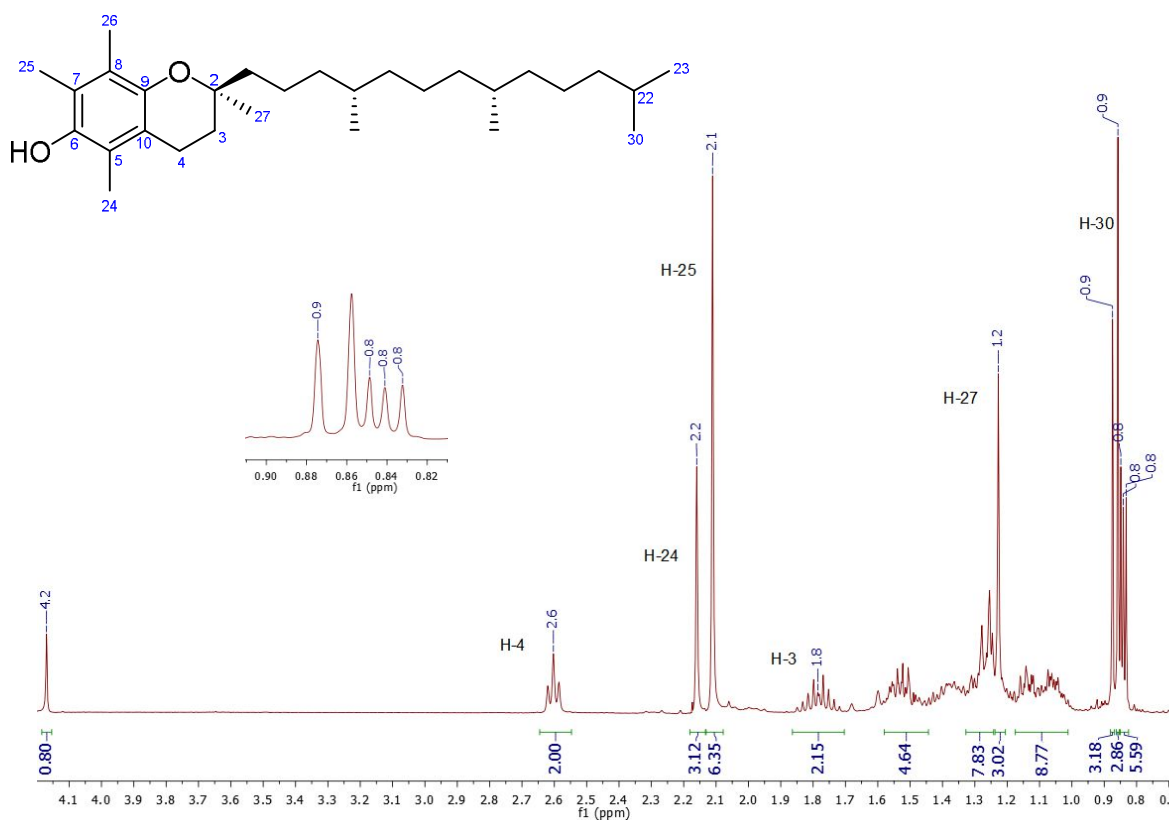
Fig. 14 RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) fragmento del espectro (4) del fitol.

### 7.1.3 $\alpha$ -Tocoferol



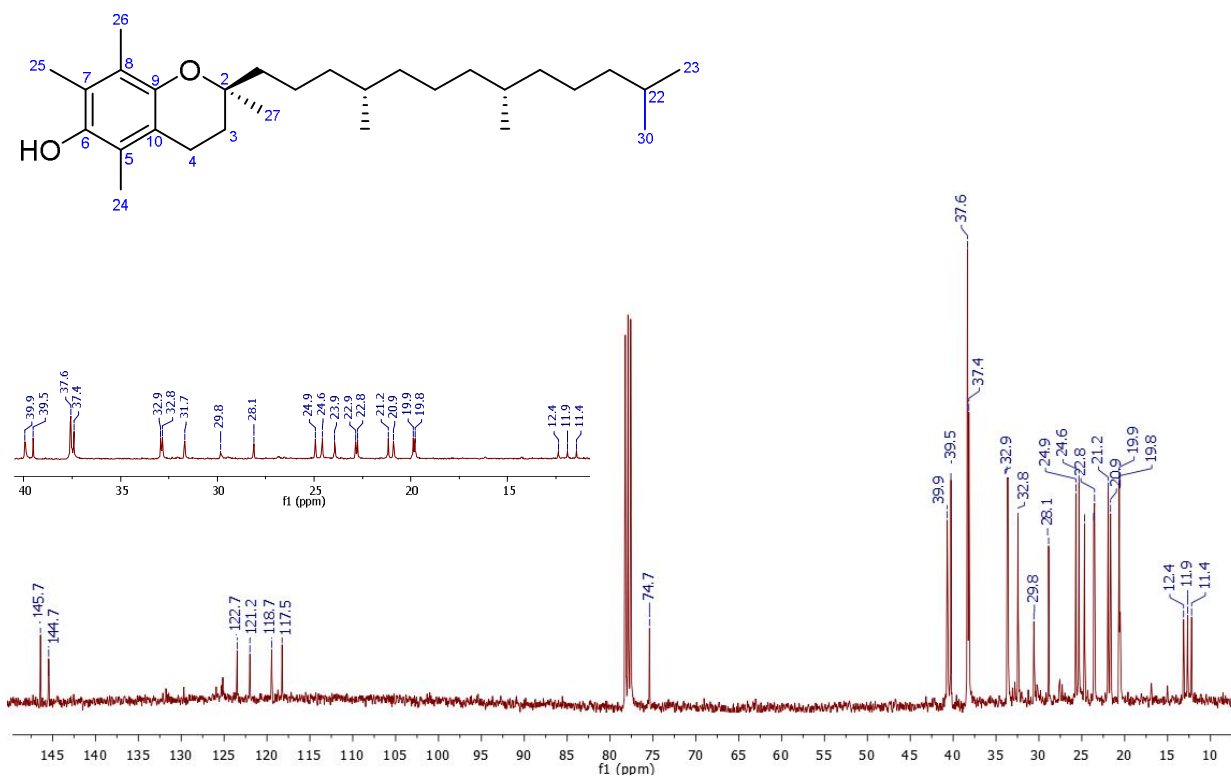
El  $\alpha$ -tocoferol fue identificado mediante RMN y por CG-EM. Para este compuesto se observan 4 señales en la región de campo bajo, una de ellas en  $\delta$  4.2 s (1H), que por desplazamiento químico y su multiplicidad simple, corresponde al protón del fenol. También se observa en el espectro una señal triple en  $\delta$  2.3 con una constante de acoplamiento en 6.9 Hz que integran para dos protones, correspondientes al metileno H-4. Las señales con desplazamiento en  $\delta$  2.2 (3H) y 2.1 (6H) son singuletes, e indican la presencia de tres metilos sobre anillo aromático. Dos señales múltiple en  $\delta$  1.8 y 1.5 que integran para dos y un protón, respectivamente

pertencientes a los metinos unidos a metilo. El desplazamiento químico del metileno en  $\delta$  1.2 sugiere su unión a un carbono base de oxígeno. Adicionalmente, en este espectro se observan señales dobles en  $\delta$  0.80 (3H), 0.84 (3H) y 0.83 (6H) que indican la existencia de 4 metilos alifáticos, dos de los cuales son equivalentes. Estas señales permiten suponer que pertenecen a una cadena de isopreno.



**Fig. 15** RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) fragmento del espectro (5)  $\alpha$ -tocoferol

En el espectro de RMN de <sup>13</sup>C (**Fig. 15**) se observa la presencia de 29 carbonos. Las señales en  $\delta$  12.4, 11.9 y 11.4 son características de metilos. También se observa la presencia de una señal de metino en  $\delta$  74.7 que corresponde a un carbono base de oxígeno. En la zona de campo bajo se encuentran 6 señales con desplazamientos en  $\delta$  145.7, 144.7, 122.7, 121.2, 118.7 y 117.5, correspondientes a carbonos cuaternarios de tipo aromáticos.



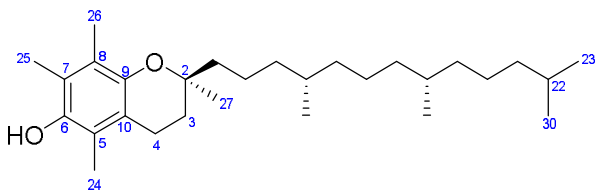
**Fig. 16** RMN $^{13}\text{C}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) fragmento del espectro (6) del  $\alpha$ -tocoferol

Entre las 22 señales de carbono que presenta el espectro DEPT existen siete carbonos cuaternarios, seis de los cuales pertenecen al anillo aromático. Dos de ellos deben estar unidos a átomos electronegativos de acuerdo con su desplazamiento químico, lo que justifica su desplazamiento a campo bajo en comparación con el resto de los carbonos cuaternarios. El carbono restante corresponde a un carbono base de oxígeno. Ocho señales de metileno se encuentran desplazados en  $\delta$  39.7, 39.3, 37.4, 37.2, 31.6, 29.7, 24.7, 24.4, 20.9 y 20.8, pertenecientes a tres unidades de isopreno. Por otro lado, las señales con desplazamiento en  $\delta$  32.7, 32.6, 27.9, 23.8, 22.7, 22.6, 19.7, 19.6, 12.2, 11.7, y 11.3 suman once carbonos de naturaleza  $\text{CH}_3$  o  $\text{CH}$ .

A fin de seguir con el desarrollo de la propuesta estructural, se realizaron los experimentos bidimensionales de HMBC Y HSQC, lo cual permitió el análisis de las correlaciones de los hidrógenos con los respectivos carbonos de la molécula, los cuales se muestran en la tabla 7.

Mediante los análisis espectroscópicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , así como las de las correlaciones observadas en los experimentos de HSQC y HMBC, y su posterior comparación de sus datos

espectroscópicos con los reportados en la literatura, permitió establecer su identidad como  $\alpha$ -tocoferol.



**Tabla 6. Comparación de datos de HSQC de  $\alpha$ -tocoferol.**<sup>37</sup>

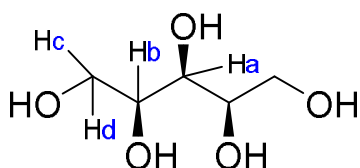
<sup>1</sup> H	DEPT	Reportado HMBC	Compuesto HMBC
1.73, 1.69	CH <sub>2</sub>	31.8, 40, 24, 74.7, 117.6	24, 40.1, 117, 74
1.16	CH <sub>3</sub>	24, 40, 74.7	23.9, 74.8, 39.9,
0.80, 0.80 (3H, d, J=1.15 Hz)	CH <sub>3</sub>	22.9, 28.2	22.9, 28.3
0.79 (3H, d, J=1.15 Hz)	CH <sub>3</sub>	32.75, 37.52	33.2, 37.8
2.53	CH <sub>2</sub>	31.8, 74.7, 117.6, 145.7	31.7, 74.8, 117.4, 145.7
0.78	CH <sub>3</sub>	33, 37.7	33.2, 37.8
0.77	CH <sub>3</sub>	33, 37.7	33.2, 37.8
2.09	CH <sub>3</sub>	121.2, 144.7	120.6, 144.7
2.04	CH <sub>3</sub>	118.7, 145.7	118.7, 144.7
2.04	CH <sub>3</sub>	118.7, 122.8, 145.75	118.7, 122.8, 144.7

**Tabla 7. Comparación de datos de <sup>13</sup>C del  $\alpha$ -tocoferol**

Reportado		Compuesto
<sup>o</sup> N	<sup>13</sup> C	<sup>13</sup> C
9	145.7	145.7
6	144.7	144.7
8	122.7	122.8
5	121.7	121.2
7	121.2	118.7
10	118.7	117.6
2	74.7	74.7
11	39.5	40
	39.5	39.6
	37.6	37.7
	37.4	37.6
	37.4	37.5
	32.9	33.0
	32.8	32.9
3	31.7	31.8
	29.8	29.9
22	28.1	28.2
	24.9	25
	24.6	24.7
27	23.9	24
	22.9	23
30	22.8	22.9
	21.2	21.3
4	20.9	21
	19.9	20
	19.8	19.9
24	12.4	12.4
25	11.9	12.0
26	11.4	11.5
9	145.7	145.7

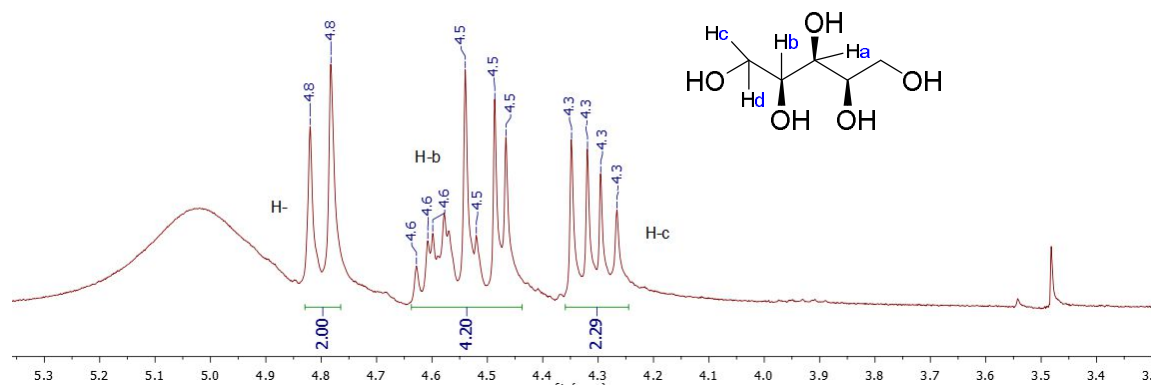
Tabla 8. Comparación de datos de HSQC de $\alpha$ -tocoferol			
$^{13}\text{C}$	DEPT	Reportado HSQC	Compuesto HSQC
40	CH <sub>2</sub>	1.48, 1.46, 1.44	1.50, 1.47, 1.44
39.6	CH <sub>2</sub>	1.44	1.42
37.7	CH <sub>2</sub>	1.07	1.05
33	CH <sub>2</sub>	1.20, 0.99	1.2, 0.9
31.8	CH	1.73, 1.69	1.8
29.9	CH <sub>2</sub>	1.19	1.20
28.2	CH <sub>2</sub>	1.45	1.45
25	CH	1.14	1.15
24.7	CH <sub>2</sub>	1.24	1.22
24	CH <sub>2</sub>	1.16	1.2
23	CH <sub>3</sub>	0.80 (3H, d, J=1.15 Hz)	0.9 (3H, d, J=1.15 Hz)
22.9	CH <sub>3</sub>	0.79 (3H, d, J=1.15 Hz)	0.80 (3H, d, J=1.15 Hz)
21.3	CH <sub>3</sub>	1.67	1.6
21	CH <sub>2</sub>	2.53 (2H, t, J=6.8 Hz)	2.54 (2H, t, J=6.8 Hz)
20	CH <sub>2</sub>	0.78	0.80
19.9	CH <sub>3</sub>	0.77	0.71
12.4	CH <sub>3</sub>	2.09	2.2
12.0	CH <sub>3</sub>	2.04	2.1
11.5	CH <sub>3</sub>	2.04	2.2

#### 7.1.4 Glucitol



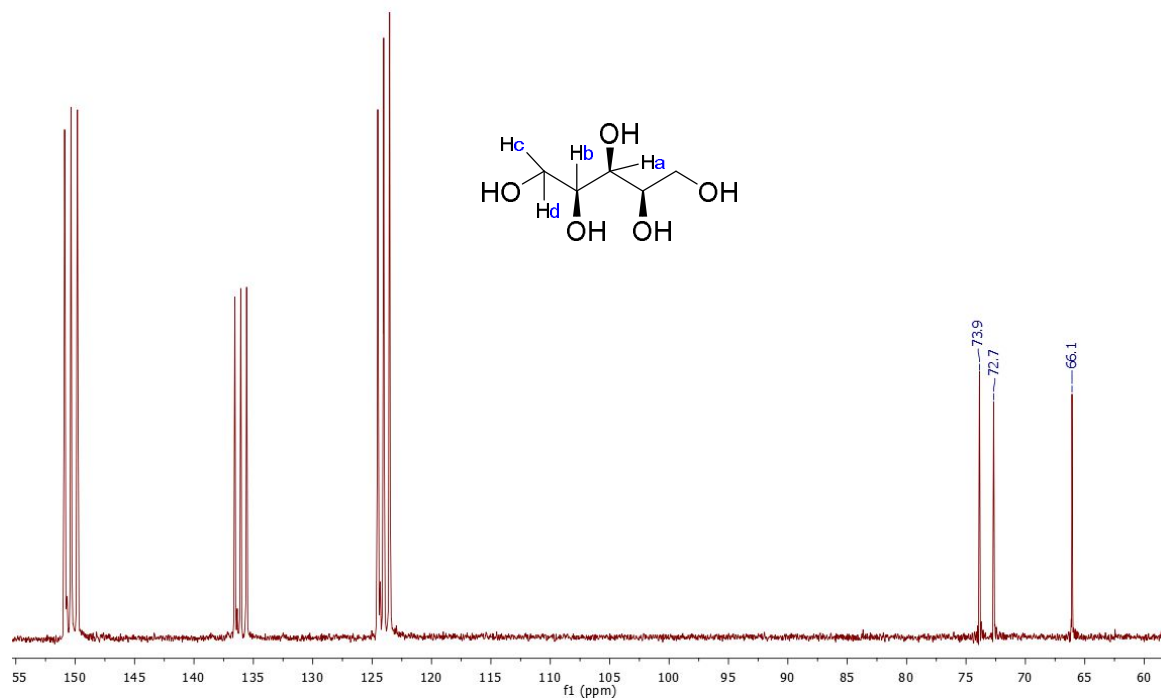
El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Fig. 17**) para este compuesto presenta una señal doble en  $\delta$  4.80 que integra para dos protones. Su constante de acoplamiento es de 7.55 Hz y pertenece al protón Ha. En un desplazamiento en  $\delta$  4.31 se presenta una señal doble de doble con constante de acoplamiento de 10.5 y 5.8 Hz, la cual integra para dos protones, y corresponde al H<sub>c</sub> y H<sub>d</sub>. Por

último, se observa una señal doble de doble en  $\delta$  4.5 ppm con constante de acoplamiento de 6.0 y 4.0 Hz, que corresponde al H<sub>b</sub>.



**Fig. 17** RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, Piridina) fragmento del espectro (7) del glucitol

En el espectro de RMN <sup>13</sup>C (**Fig. 18**), este compuesto presenta tres señales base de oxígeno, dos de las cuales corresponden a metinos con un desplazamiento de  $\delta$  73.0 y 71.8, y la última señal en  $\delta$  65.3 corresponde a un metileno.



**Fig. 18** RMN<sup>13</sup>C (200 MHz, Piridina) fragmento del espectro (8) del glucitol

## 7.2 Análisis de CG-EM

Se realizó un estudio de la composición química de los compuestos volátiles del extracto acetónico peracetilado; a través de la técnica de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-EM). Mediante este análisis se identificaron 11 compuestos, 61.17 % de los compuestos volatilizables de este extracto está constituido por glucitol, el 21.51% es sacarosa y el 6.08% se identifica como  $\beta$ -sitosterol. La identificación de estos compuestos se llevó a cabo mediante el análisis de sus patrones de fragmentación, los cuales fueron comparados con los patrones de fragmentación reportados en la literatura.

Compuesto	TR	Abundancia
Glicerol (Triacetin)	24.04	1.8%
Glicerol (Diacetin)	25.71	0.26
Fitol	57.94	1.7
Fitona	58.24	0.91
Manitol	61.72	0.34
Ester Metílico Del Ácido Hexadecanoico	62.30	0.19
Sorbosa (Pentaacetilada)	67.65	0.39
Pinitol (Pentaacetilpinitol)	68.45	4.41
Glucitol (Pentaacetilglucitol)	68.97	49.03
Glucitol (Hexaacetilglucitol)	71.67	12.14
Sacarosa (Octaacetilsacarosa)	107.06	21.51
$\beta$ -Sitosterol	116.99	6.08
Ácido Ursólico	125.56	1.24

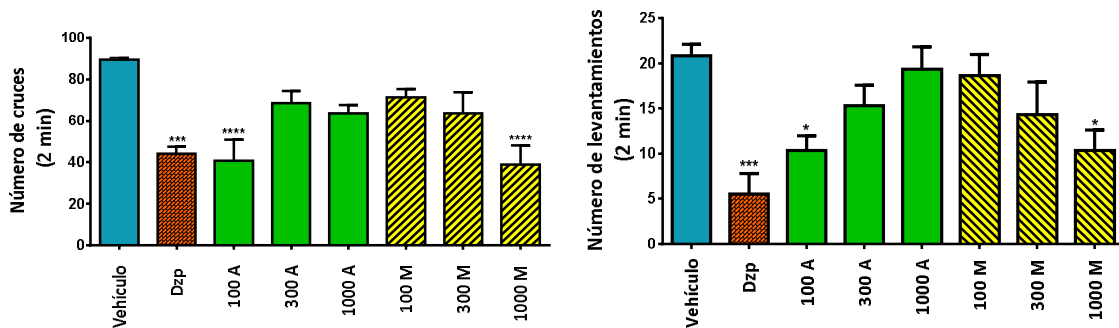
El contenido de los compuestos volátiles y volatilizables presentes en el extracto metanólico peracetilado de esta fuente natural se indican en la tabla.

Compuesto	TR	Abundancia
Glucitol (Pentaacetilglucito)	69.91	56.7 %
Glucitol (Hexaacetilglucitol)	72.33	40.70 %
Sacarosa (Tetraacetato)	109.68	2.37 %
$\beta$ -sitosterol	112.94	0.23 %

## 7.3 Evaluación biológica

### 7.3.1 Evaluación del efecto ansiolítico

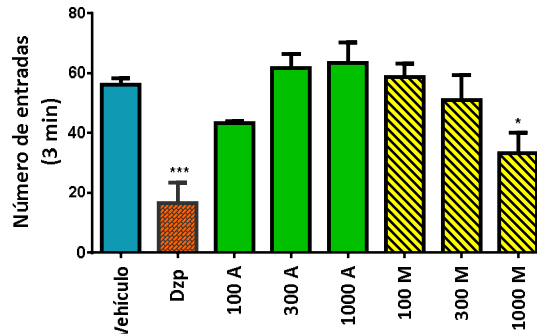
#### 7.3.1.1 Prueba De Campo Abierto



**Figura 2.** Evaluación del efecto sedante/ansiolítico en la prueba de campo abierto. Cada barra representa el promedio de 6 animales  $\pm$  e.e.m. Vehículo (VEH, solución salina 0.9%), Diazepam (Dzp, 3 mg/kg, i.p.), extracto acetónico (A, 100-1000 mg/kg, p.o.) y metanólico (M 100-1000 mg/kg, p.o.) de *Nernstia mexicana*. La diferencia estadística \* $p < 0.05$  fue determinada utilizando una ANOVA de 1 vía seguido de una prueba post hoc de Dunnett.

En la figura 22 se muestra que tras la administración del diazepam (control positivo 3 mg/kg) disminuyó el número de cruces y levantamientos en un 45% y 40% respectivamente con respecto al vehículo, indicando cambios en la locomoción espontánea en ratones. Cuando se administra el extracto acetónico se observa que a la dosis más baja administrada (100 mg/kg) hay una disminución del número de cruces (fig. 22 A) y levantamientos (figura 22 B), en ambos casos de 46% y 52% con respecto al vehículo. Sin embargo, este efecto disminuye a medida que se incrementa la dosis. Por otra parte, la administración del extracto metanólico ocasiona un efecto dependiente de la dosis, a medida que incrementa la dosis, a la dosis más alta evaluada (1000 mg/kg, p.o.) tanto el número de cruces (43%) como de levantamientos disminuye (52%) con respecto al vehículo.

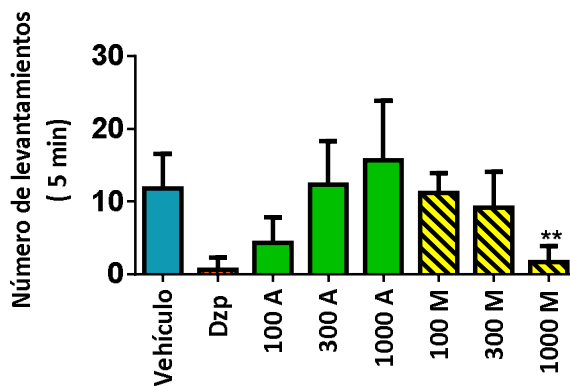
### 7.3.1.2 Prueba de tablero perforado



**Figura 23.** Curvas dosis respuesta del efecto sedante en pruebas farmacológicas (Tablero perforado). Cada barra representa el promedio de 6 animales  $\pm$  e.e.m. Vehículo (VEH, solución salina 0.9%), Diazepam (DZP, 3 mg/kg, i.p.), extracto acetónico (AC, 100-1000 mg/kg, p.o.) y metanólico (MEOH, 100-1000 mg/kg, p.o.) de *Nernstia mexicana*. La diferencia estadística \* $p < 0.05$  fue determinada utilizando una ANOVA de 1 vía seguido de una prueba post hoc de Dunnett.

Los resultados representados en la **Fig.23** muestra que la administración del extracto metanólico a la dosis de 1000 mg/kg y acetónico a la dosis de 100 mg/kg en los ratones disminuye en un 55.6% y 72% el número de veces en que los ratones inclinan su cabeza en los orificios del tablero durante 3 minutos, indicando un efecto depresor, este efecto no es mayor que el generado por el diazepam, que disminuye hasta 41% la actividad de los ratones.

### 7.3.1.3 Prueba de cilindro de exploración



**Figura 4.** Curvas dosis respuesta del efecto sedante en pruebas farmacológicas (Cilindro de exploración). Cada barra representa el promedio de 6 animales  $\pm$  e.e.m. Vehículo (VEH, solución salina 0.9%), Diazepam (Dzp, 3 mg/kg, i.p.), extracto acetónico (A, 100-1000 mg/kg, p.o.) y metanólico (M (100-1000 mg/kg, p.o.) de *Nernstia mexicana*. La diferencia estadística \* $p < 0.05$  fue determinada utilizando una ANOVA de 1 vía seguido de una prueba post hoc de Dunnett.

En la **fig. 24** se observa el promedio del número de levantamientos sobre las patas traseras del ratón, en un cilindro durante 5 minutos. En esta prueba el extracto metanólico (1000 mg/kg) presento una disminución del número de levantamientos del 19.6% al igual que diazepam, 12.5% La administración del extracto acetónico mostró un efecto contrario ya que al aumentar la dosis se incrementó el número de levantamientos.

#### 7.3.1.4 Laberinto elevado

<b>Grupo</b>	<b>Dosis (mg/kg)</b>	<b>Permanencia en los brazos abiertos (s)</b>
Vehículo	-	90.5 ± 13.0
Diazepam	3	163.2 ± 7.4
Extracto acetónico	100	60.1 ± 24.5
	300	139.1 ± 7.5*
	1000	135.0 ± 16.2*
Extracto Metanólico	100	92.3 ± 12.3
	300	141.6 ± 20.3*
	1000	149.5 ± 21.5*

En la **tabla 11** se muestra el registro del tiempo de permanencia en los brazos abiertos dentro del laberinto elevado durante 5 minutos. La administración de DZP ocasiona que aumente el tiempo en los brazos abiertos, esto es un indicativo de efecto ansiolítico. En la misma tabla se muestra que la administración de los extractos acetónico y metanólico también aumentan el tiempo de permanencia en brazo abierto, pero solo a las dosis altas evaluadas (300 y 1000 mg/kg).

### 7.3.1.5 Evaluación de la actividad Anticonvulsiva

**Tabla 12. Efecto de la actividad anticonvulsiva de los extractos metanólico y acetónico de *Nernstia mexicana***

Grupo	Dosis (mg/kg)	Latencia (s)			Mortalidad
		Mioclónicas	Tónicas	Muerte	
Vehículo + PTZ	-	39.1 ± 1.9	155 ± 45.38	932.3 ± 243.1	6/6
Diazepam	3	-	-	-	0/6
Extracto Acetonico	100	241 ± 4.6*	354.3 ± 86.1*	603.8 ± 160.9	6/6
	300	40.8 ± 3.4	249.2 ± 52.7	797.5 ± 231.0	6/6
	1000	39.6 ± 1.2	367.8 ± 41.1*	968.3 ± 282.2	6/6
Extracto metanólico	100	36.6 ± 1.3	309.3 ± 49.9*	518.3 ± 71.3	6/6
	300	67.1 ± 26.8	292.3 ± 73.5*	291.1 ± 102.2	4/6
	1000	43.6 ± 3.8	136.27 ± 60.94	563 ± 250.5	4/6

La administración de PTZ provoca convulsiones mioclónicas, tónicas y finalmente la muerte, las cuales se presentan en el 100% de los ratones tratados. La administración de diazepam impide la presencia de convulsiones tónicas, mioclónicas y reduce la muerte de los roedores esto debido a que se caracteriza por ser un fármaco protector por ser anticonvulsivo. La administración del extracto acetónico a la dosis de 100 mg/kg aumenta la latencia de la presencia de convulsiones de tipo mioclonia y tónica, sin embargo, la muerte no se ven modificadas ya que no hay diferencia estadística. Por lo que no se puede considerar que tenga propiedades anticonvulsivas. Al incrementar la dosis del extracto acetónico (300 mg/kg) se observa un aumento del tiempo en la presencia de convulsiones tónicas en el que se presentan las convulsiones, pero tampoco previene la muerte de los animales. Con respecto a la administración del extracto metanólico si se observa una disminución del tiempo en el que se presentan las convulsiones, aunque éstas no tienen diferencia estadística con respecto al control se puede observar una disminución e incluso a la dosis de 300 y 1000 mg/kg se previene la muerte en un 4/6.

### 7.3.1.6 Evaluación de la actividad Sedante-hipnótica

Grupo	Dosis (mg/kg)	Latencia (Seg)	
		Sedación	Hipnosis
Vehículo + PB	-	70.3±6.1	163.6±5.0
Diazepam + PB	3	46.3±4.1 *	113.3±10.3 *
Extracto Acetónico + PB	1000	55.3±5.9	144.5±9.6
Extracto metanólico + PB	1000	47.2±5.5*	153±4.3

En la tabla 4 se muestra que cuando se administra DZP en combinación con pentobarbital ocasiona que el efecto sedante e hipnótico se potencie ya que el tiempo en el cual los animales entran a una fase de sedación e hipnosis disminuye 24 y 50 segundos menos con respecto al vehículo respectivamente. Cuando se administró el extracto acetónico y metanólico a la dosis de 1000 mg/kg se observa que hay una disminución del tiempo en el cual se presenta el efecto sedante e hipnótico, esta tendencia indica una posible potenciación de ambos extractos sobre el efecto que genera el pentobarbital.

### 7.4. Discusión de resultados

En este estudio, se prepararon y evaluaron los extractos metanólicos y acetónicos de las partes aéreas de *Nerstia mexicana*, para validar el uso popular como sedante y tranquilizante. Se ha informado que en la familia de las Rubiaceas existen especies que presentan propiedades sedantes entre ellas, *Acute mitragyna* la cual causó un efecto sedante, deteriorando la memoria de los ratones; también se observó que presenta propiedades ansiolíticas.<sup>38</sup> De igual forma *Morinda citrifolia* presento propiedades ansiolíticas debido a que disminuye la actividad locomotora en ratones.<sup>39</sup>

Entre las pruebas disponibles para evaluar un perfil neurofarmacológico se puede incluir la determinación del efecto sobre la conducta exploratoria, la evaluación de la actividad ansiolítica, el efecto sedante-hipnótico y la actividad anticonvulsiva.<sup>40</sup>

En este estudio, evaluamos el posible efecto ansiolítico de la administración de los extractos metanólicos y acetónico en diferentes paradigmas conductuales, la prueba de campo abierto, tablero perforado, cilindro de exploración, laberinto elevado. Los resultados obtenidos demuestran que la administración del extracto acetónico tiene efecto sedante a bajas dosis y un efecto excitatorio a la dosis más alta (1000 mg/kg) mientras que el extracto metanólico tiene un efecto sedante dependiente de la dosis.

Mediante el análisis de Cromatografía en Columna Abierta (CCA), fue posible identificar el ácido ursólico como el principal componente del extracto acetónico mientras que el componente mayoritario para el extracto metanólico es el glucitol, estos extractos fueron obtenidos de las partes aéreas de *Nerstia mexicana*.

Existen evidencias de que el ácido ursólico es capaz de producir un efecto depresivo significativo en el SNC al reducir la actividad motora espontánea, también tiene efecto anticonvulsivo y previene la muerte de ratones por administración de pentilentetrazol (PTZ).<sup>32</sup>

Con la administración del extracto acetónico se observó que a dosis bajas (100 mg/kg, p.o.) se genera un efecto ansiolítico al disminuirse el número de cruces y levantamientos en el campo abierto. El efecto del comportamiento observado es indicativo de una acción ansiolítica en la pruebas empleada, debido a que la prueba de campo abierto permite hacer inferencias sobre el comportamiento ansiosos ya que los compuestos ansiolíticos conducen a un aumento en el tiempo total de permanencia en el centro del aparato y a una disminución en el levantamiento en sus patas traseras. Sin embargo, al incrementar la dosis del extracto acetónico el efecto ansiolítico se pierde.

Con respecto a la administración del extracto metanólico se observó un efecto ansiolítico dosis dependiente, disminuyendo el número de cruces, levantamientos en la prueba de exploración. documentado que en estas pruebas están implicados los neurotransmisores monoaminérgicos, particularmente la serotonina (receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>3</sub>), la noradrenalina (receptor  $\alpha_1$ ) y la dopamina (D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>receptores), estos ejercen una gran influencia en los circuitos cerebrales implicados en la regulación del estado de ánimo.<sup>33 34</sup>

Para reforzar las propiedades ansiolíticas que presenta el extracto acetónico y metanólico se probó el efecto en la prueba de tablero perforado, es un procedimiento ampliamente utilizado para medir la respuesta de un animal a un ambiente desconocido. Así mismo se utiliza para evaluar la emoción, ansiedad y la respuestas al estrés en animales.<sup>41</sup> Los resultados muestran que la administración oral del extracto acetónico, a una dosis de 100 mg/kg, presentó un comportamiento de tipo ansiolítico en la prueba de campo abierto, presenta el mismo efecto. Para el caso del extracto metanólico la dosis de 1000 mg/kg fue la más efectiva debió a la disminuyo el número de veces en un que los ratones inclinan su cabeza en los orificios del tablero.

Se probó su efecto del extracto metanólico y acetónico de *Cigarrilla mexicana* en la prueba laberinto elevado, es una prueba establecida y la más utilizada para detectar un efecto ansiolítico/similar a la ansiedad. Esta prueba es similar a la de campo abierto, el laberinto elevado más se basa en el conflicto natural entre la unidad para explorar un nuevo entorno y la tendencia a evitar un área potencialmente peligrosa.<sup>42</sup> Los índices de comportamiento similar a los ansiolíticos, en la prueba de laberinto elevado a medición de la ansiedad está dada por el número de entradas en los brazos abiertos expresada como el porcentaje del total de entradas y la cantidad de tiempo que permanecen en ello.<sup>43</sup> Los resultados demuestran que la administración de 1000 mg/kg del extracto metanólico y acetónico presentaron un comportamiento de tipo ansiolítico ya que aumentó el número de entradas en los brazos abiertos y el tiempo total que permanece en ellos, similar al resultado producido por el diazepam, utilizado como fármaco de referencia. El laberinto elevado puede considerarse una herramienta muy valiosa en la detección de compuestos con actividad relacionada con la ansiedad.<sup>44</sup>

En la actividad anticonvulsiva, el extracto metanólico de *Cigarrilla mexicana* retrasó la presencia de ataques mioclónicos y clónicos. Cabe destacar que a una concentración de 300 mg/kg la presencia de convulsiones tónicas y evito la mortalidad inducida por PTZ, lo que demuestra una actividad anticonvulsiva, esta actividad podría ser atribuida al ácido ursólico ya que se encuentra presente en los extractos. Los compuestos naturales han sido ampliamente estudiados con la esperanza de encontrar medicamentos efectivos para muchas enfermedades, incluidos los

trastornos del sistema nervioso. Parecen ser una buena fuente de terapéutica debido a su baja toxicidad. Entre los compuestos naturales que podrían afectar las funciones del sistema nervioso central se encuentran los triterpenoides pentacíclicos, por ejemplo, ácido asiático, oleanólico, betulínico, boswellico y ursólico.<sup>45</sup> Se investigaron las propiedades neuroprotectoras de estos compuestos en diferentes modelos de convulsiones y epilepsia y se observaron propiedades protectoras. La actividad anticonvulsiva del ácido ursólico proveniente *Nepeta sibthorpii* fue evaluado por primera vez por Taviano en el modelo de convulsiones inducidas por inyección de PTZ en ratones, este se administró intragástricamente a una dosis de 2,3 mg/kg teniendo como resultado la disminución en el número de convulsiones y la mortalidad animal <sup>32</sup>. Recientemente, Khan también ha investigado los efectos del ácido ursólico en la prueba PTZ, disminuyendo las convulsiones clónico-tónicas y la mortalidad.<sup>46</sup> Algunos informes muestran que el ácido ursólico mejora la transmisión GABAérgica mecanismo por el cual presenta su acción anticonvulsiva sin embargo estudios recientes sugieren que no es el único mecanismo por el que actúa, es probable que el ácido ursólico bloquee los canales de sodio o posea múltiples mecanismos anticonvulsivos.<sup>33</sup>

A las dosis probadas, los extractos de *Nerstia mexicana* modificó la latencia de la sedación e hipnosis inducidas por pentobarbital de sodio. Sin embargo, la duración del tiempo de sedación se alargó significativamente a una concentración de 1000 mg/kg del extracto metanólico siendo el más activo de los dos. En consecuencia, el efecto sedante podría ser atribuida al ácido ursólico debido a que se encuentra presente en el extracto. Se ha descrito en la literatura que el ácido ursólico alarga el tiempo de sueño a través de la activación del receptor GABA<sub>A</sub> por un aumento en las concentraciones de GABA, estos neurotransmisores están implicados en la extensión de sueño en las personas que sufren de insomnio.<sup>47</sup>

En conjunto, los resultados del presente estudio demuestran por primera vez el perfil neurofarmacológico preliminar de los extractos de *Nerstia mexicana* usando las pruebas de campo abierto, tablero de exploración, laberinto elevado entre otras, estas utilizadas para la detención de compuestos ansiolíticos. Los estudios preclínicos muestran que no solo las

benzodiazepinas, sino también los antidepresivos pueden reducir los comportamientos típicos similares a la ansiedad en roedores en estos paradigmas conductuales.<sup>48 49</sup> El presente estudio farmacológico demostró que el extracto acetónico tiene efecto sedante a bajas dosis y que el extracto metanólico tiene un efecto sedante dependiente de la dosis. La actividad sedante de *Cigarrilla mexicana* depende de la abundante presencia de ácido ursólico, estudios farmacológicos preliminares sobre el ácido ursólico han descrito que este triterpeno posee una actividad sedante produciendo un efecto de tipo ansiolítico en las pruebas de campo abierto y laberinto elevado.<sup>34</sup> Respecto al mecanismo de acción del ácido ursólico, se ha reportado la presencia de cGMP y probablemente una participación de los receptores TRPV1. Además, un sinergismo antinociceptivo entre el efecto del ácido ursólico y la inhibición de la 5-HT<sub>1A</sub> se demuestra receptores.<sup>50</sup>



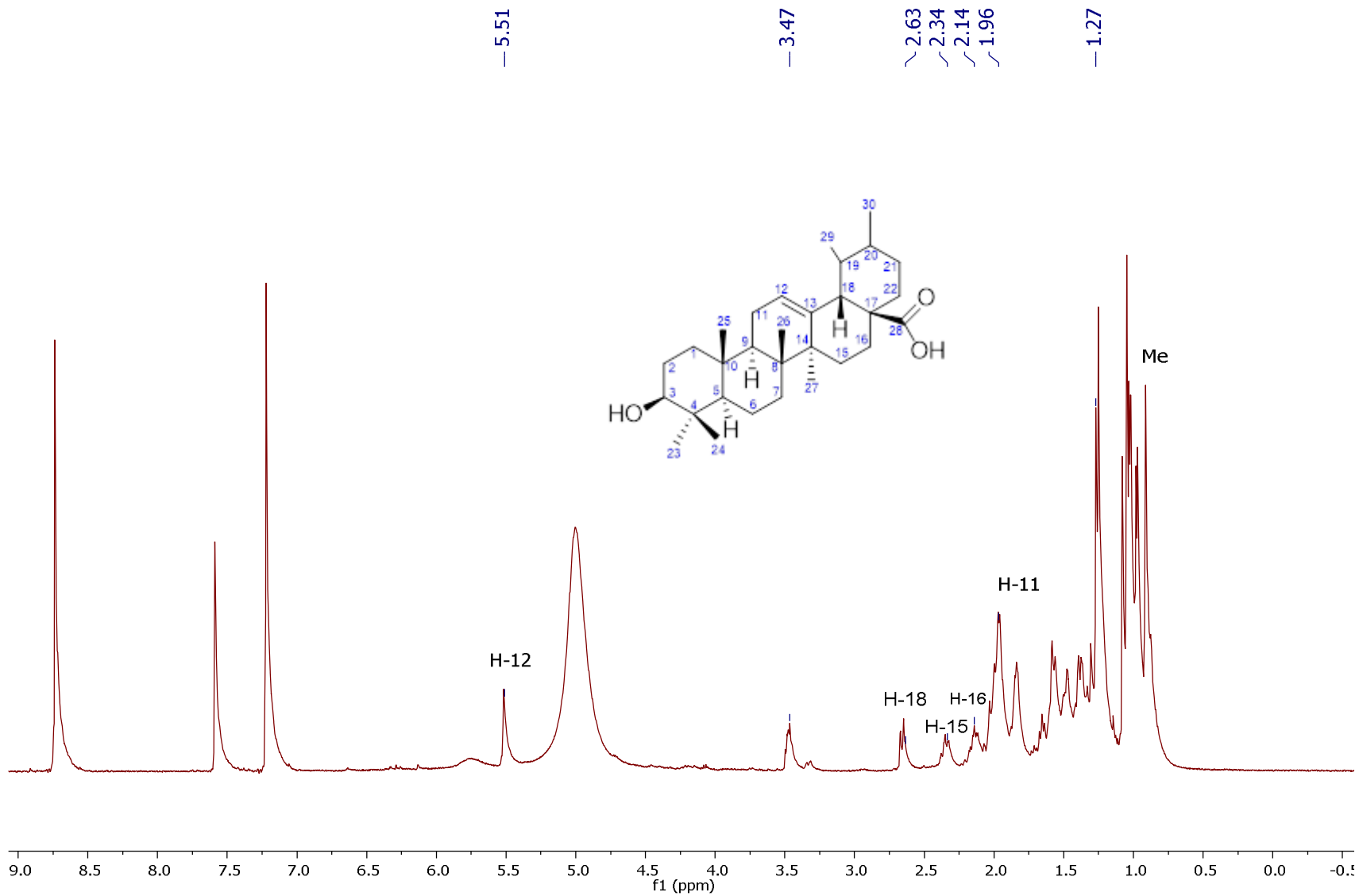
## 8.-CONCLUSIONES

## 8.1 Conclusiones

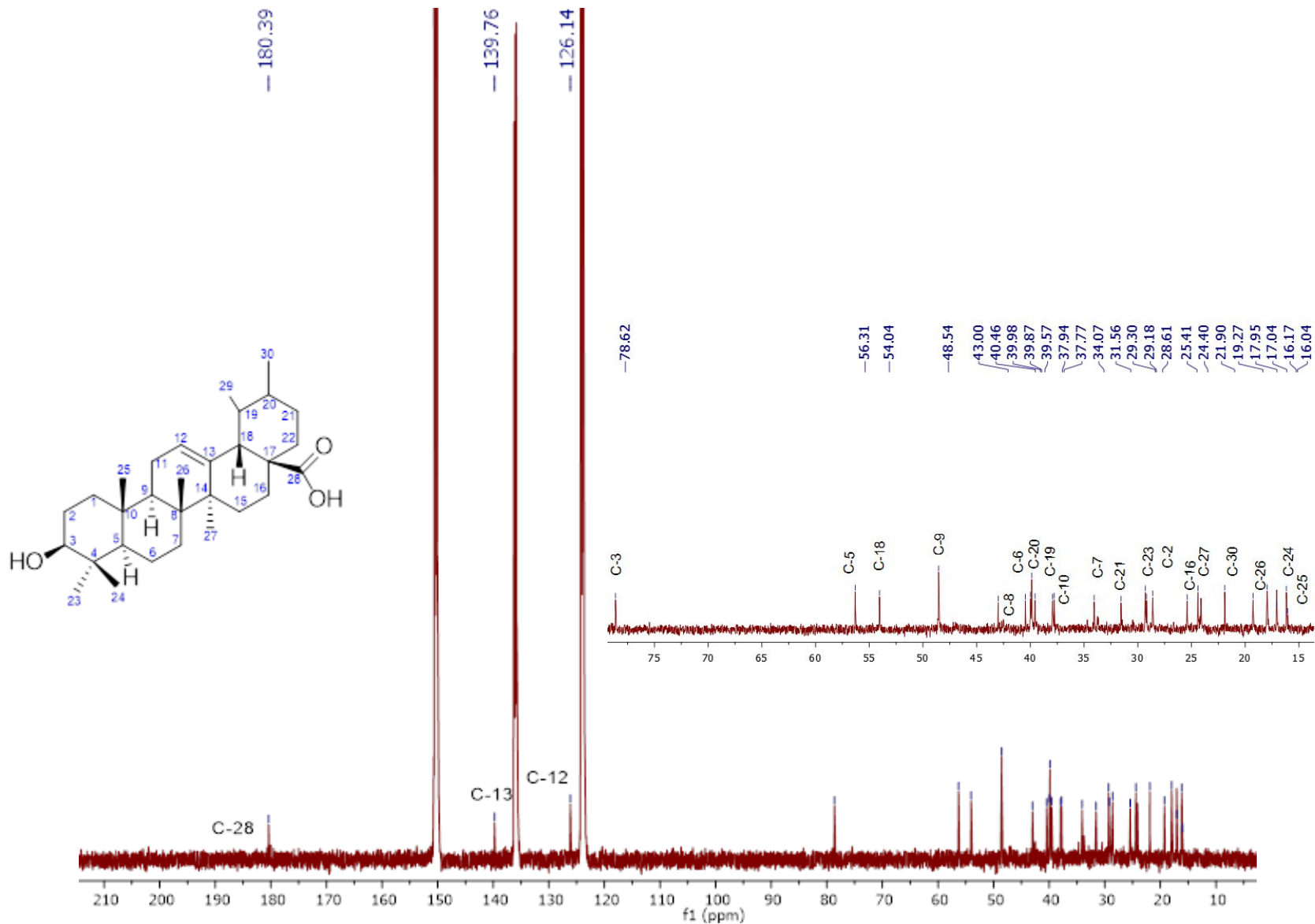
Del estudio químico del extracto acetónico de las partes aéreas de *Nerstia mexicana* se lograron caracterizar mediante técnicas espectroscópicas cuatro compuestos, dos de ellos de tipo terpenoide, los cuales provienen de la ruta biosintética de acetato mevalonato, confirmando que esta es la ruta más activa en esta planta. Cabe mencionar que se encontró un triterpeno de tipo ursano, así como una mezcla de triacilglicéridos y poliprenoles. Del estudio farmacológico se concluye que los extractos acetónico y metanólico tienen efecto sedante y ansiolítico. Se cree que el efecto se debe a la presencia de ácido ursólico, el cual es el componente mayoritario de *Nersita mexicana*.



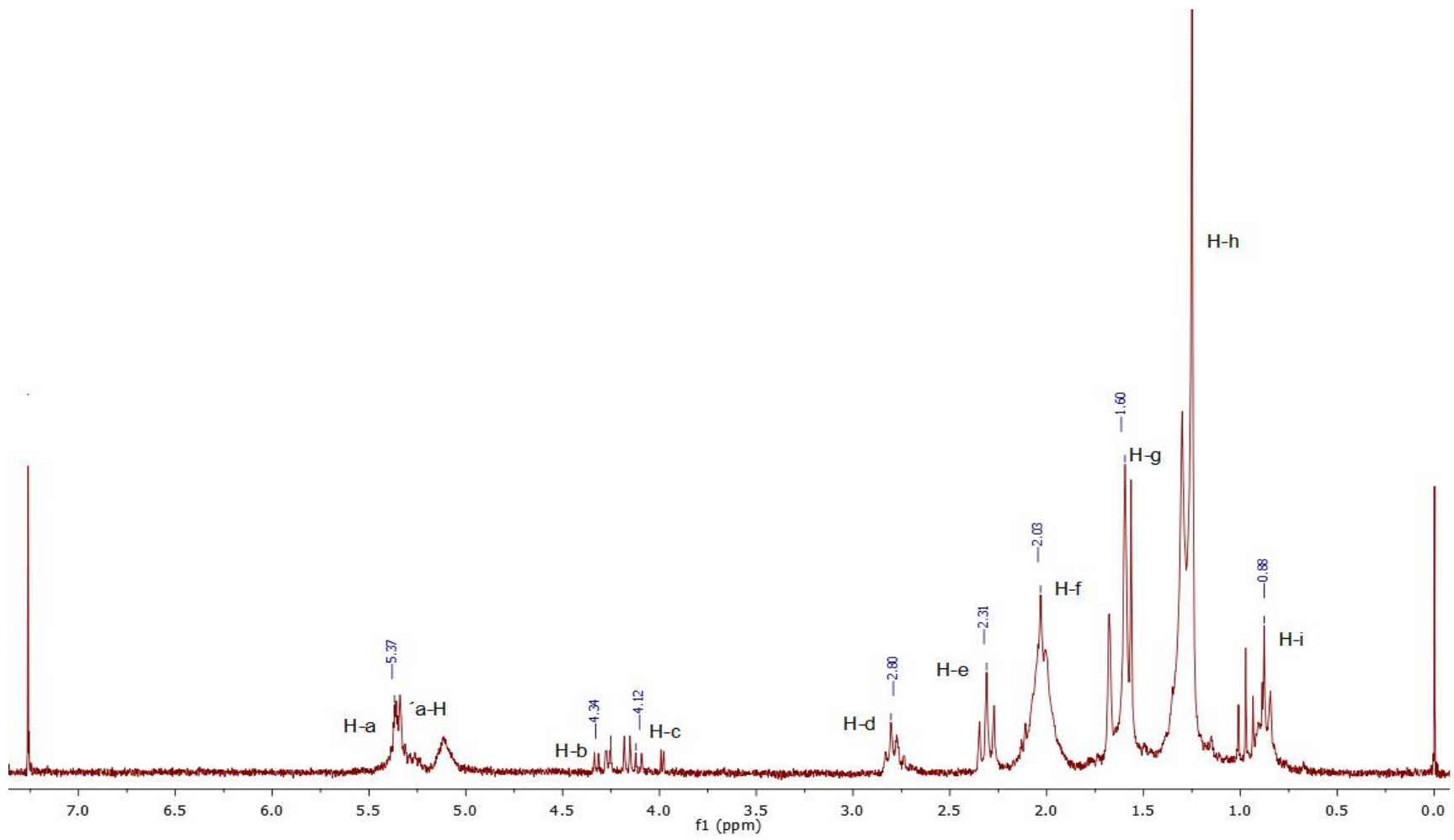
## 9.- ESPECTROS



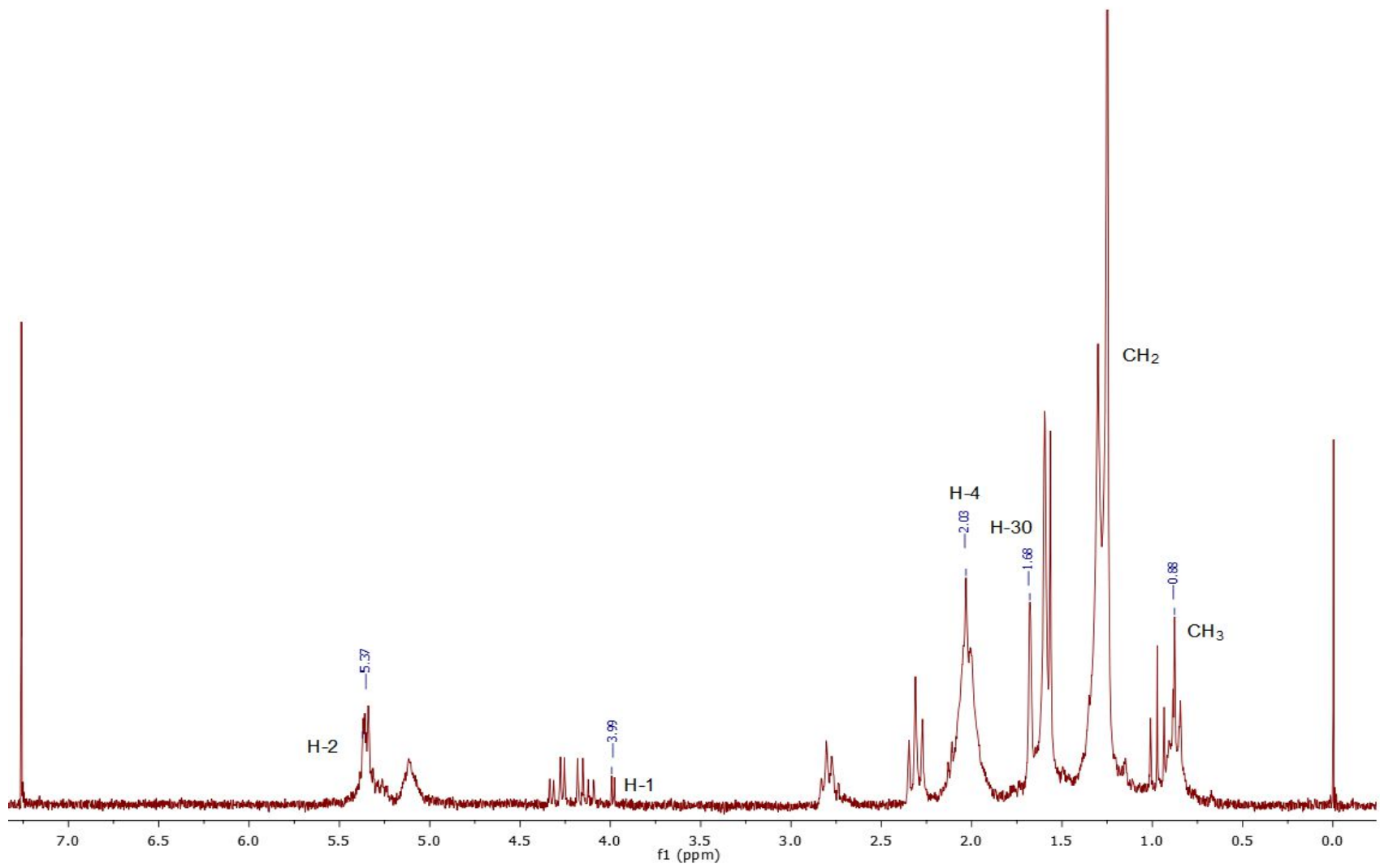
**Espectro 1.** RMN  $^1\text{H}$  Acido ursólico (500 MHz, Piridina-d5)



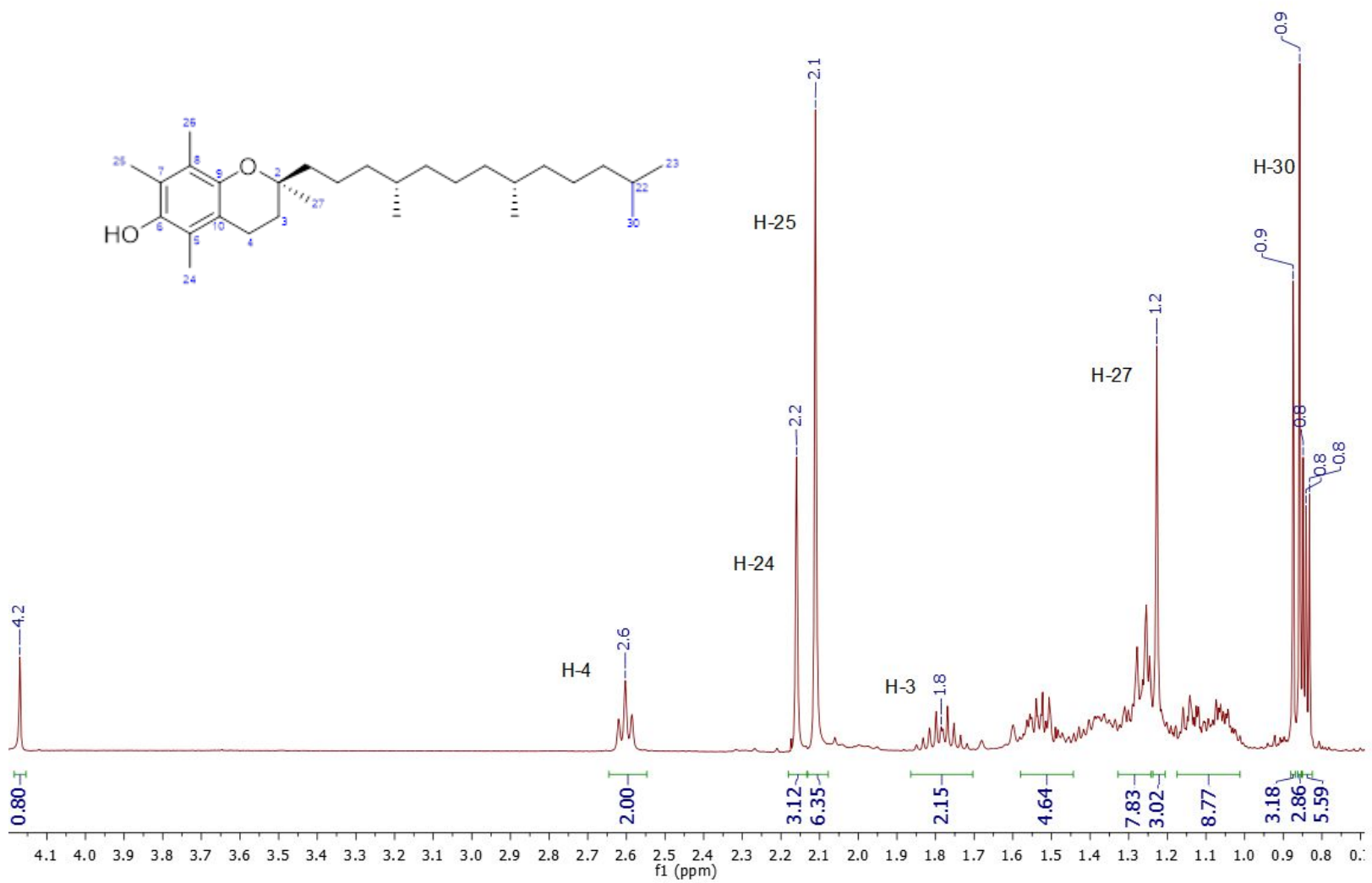
**Espectro 2.** RMN <sup>13</sup>C Acido ursólico (500 MHz, Piridina-d5)



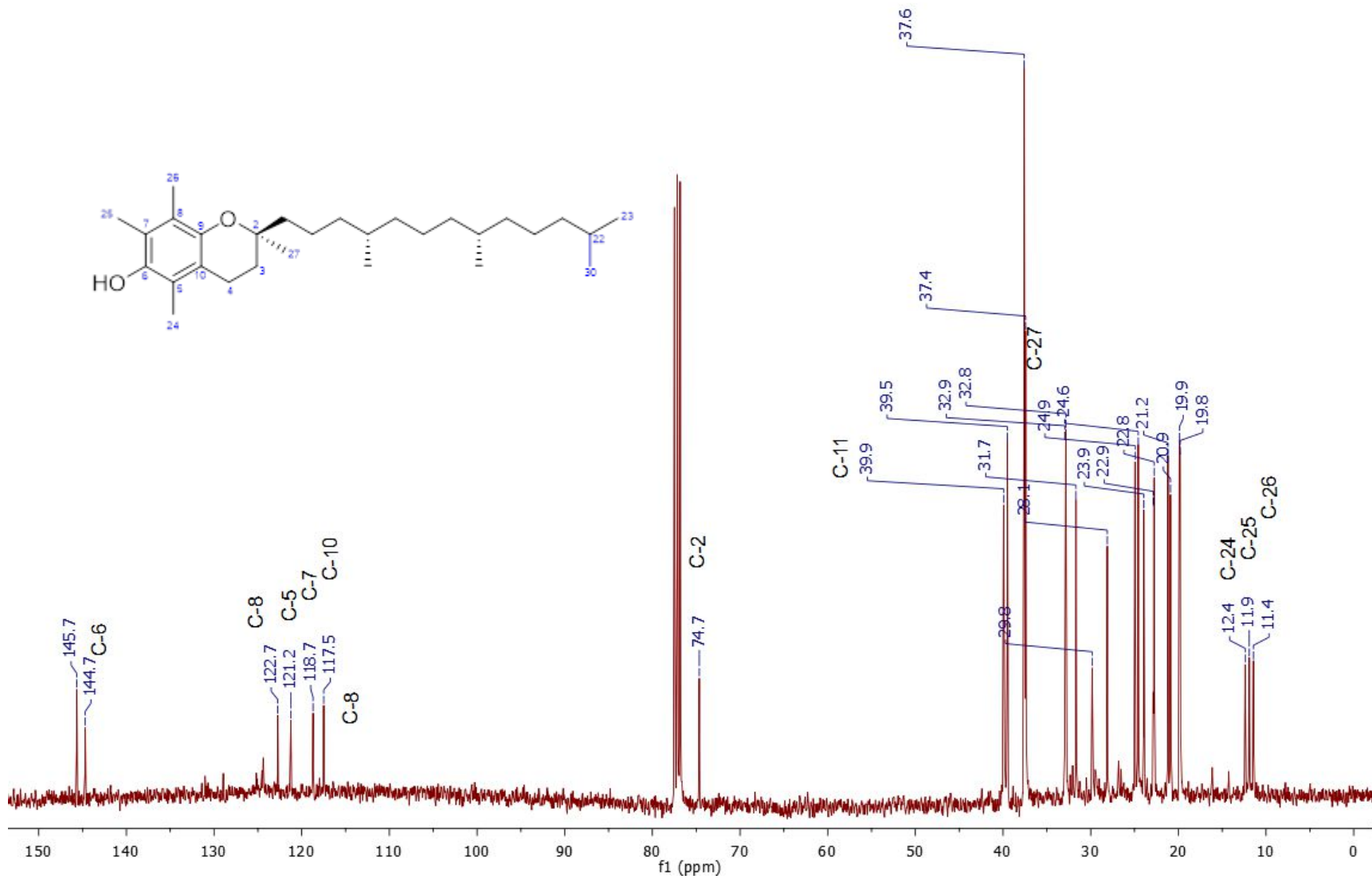
**Espectro 3.** RMN<sup>1</sup>H Triacilglicérido (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



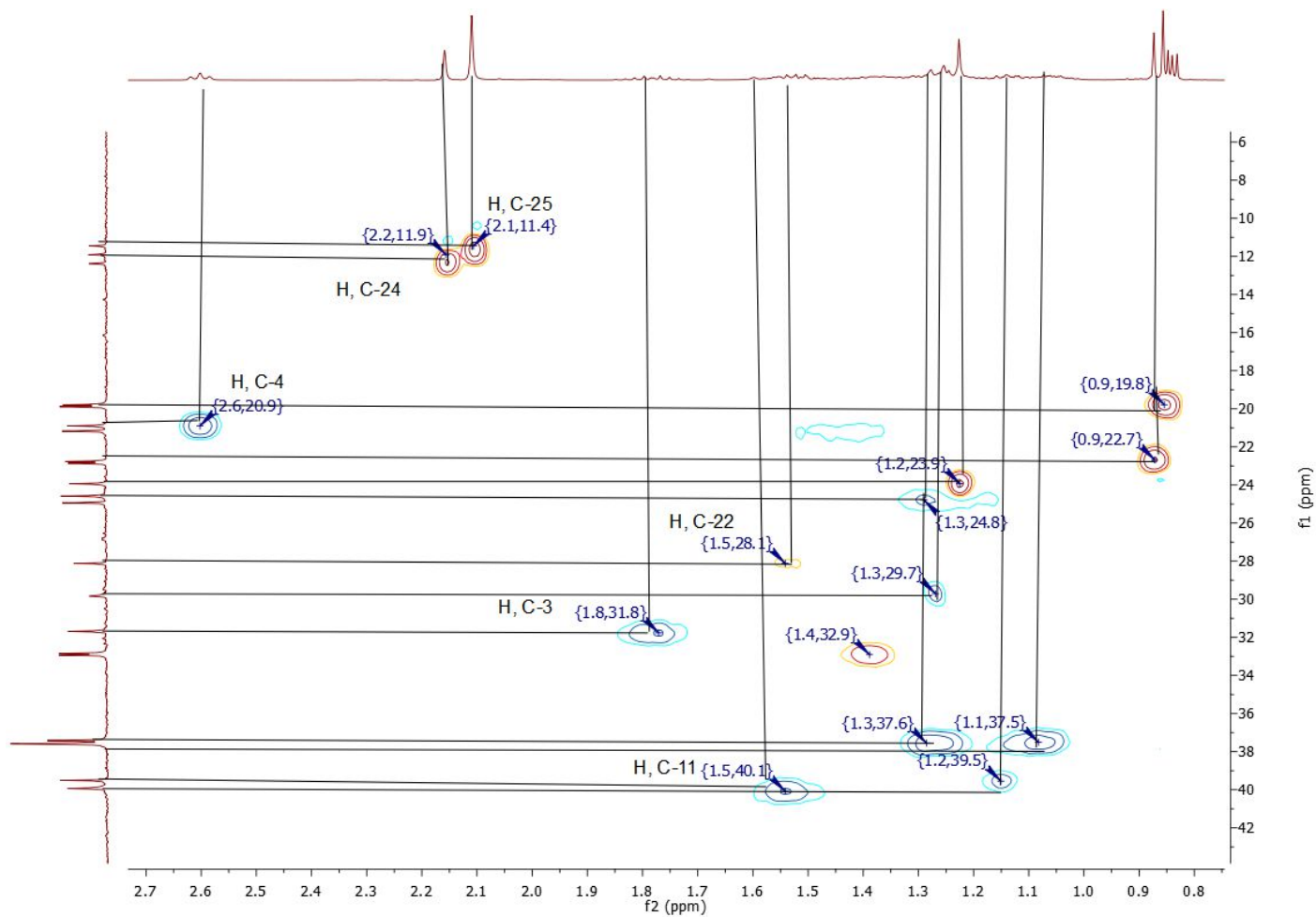
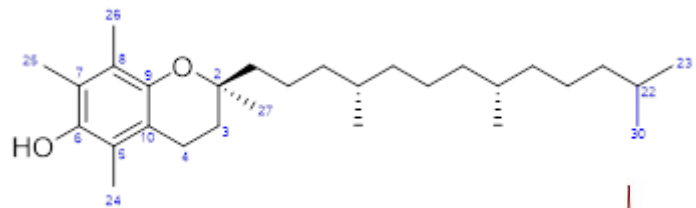
**Espectro 4.** RMN<sup>1</sup>H Poliprenoles (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



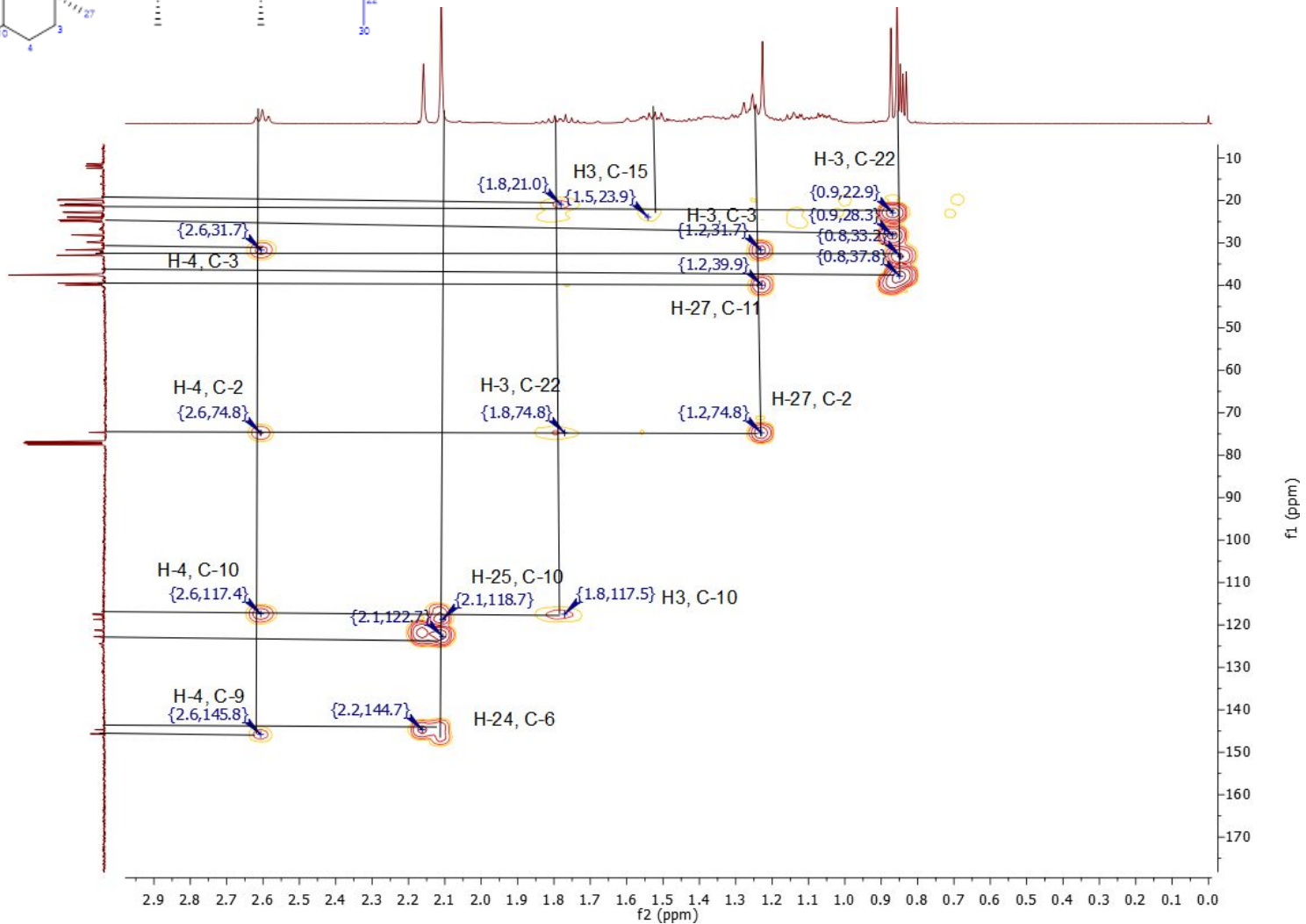
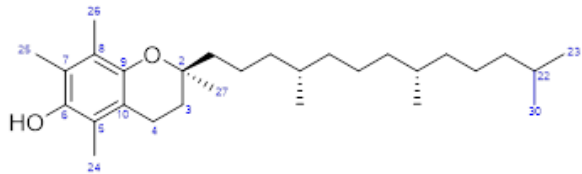
**Espectro 5.** RMN<sup>1</sup>H α-Tocoferol (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



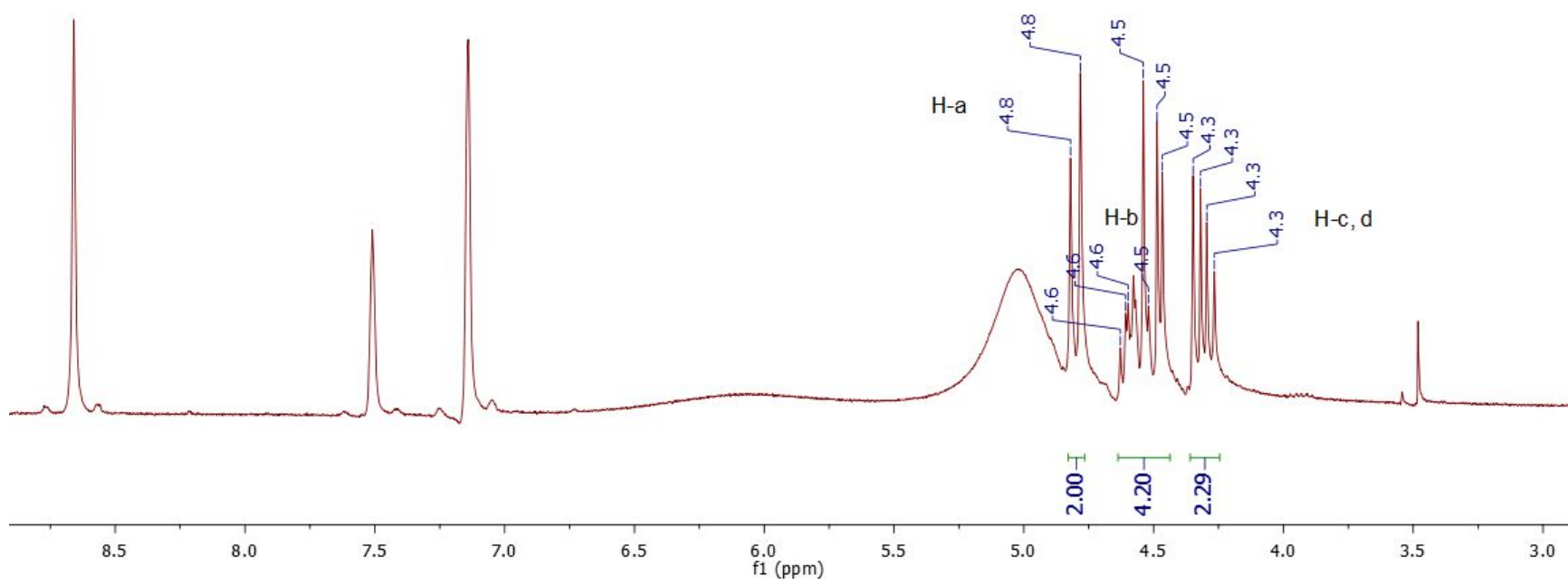
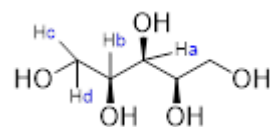
**Espectro 6.** RMN<sup>13</sup>C α-Tocoferol (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



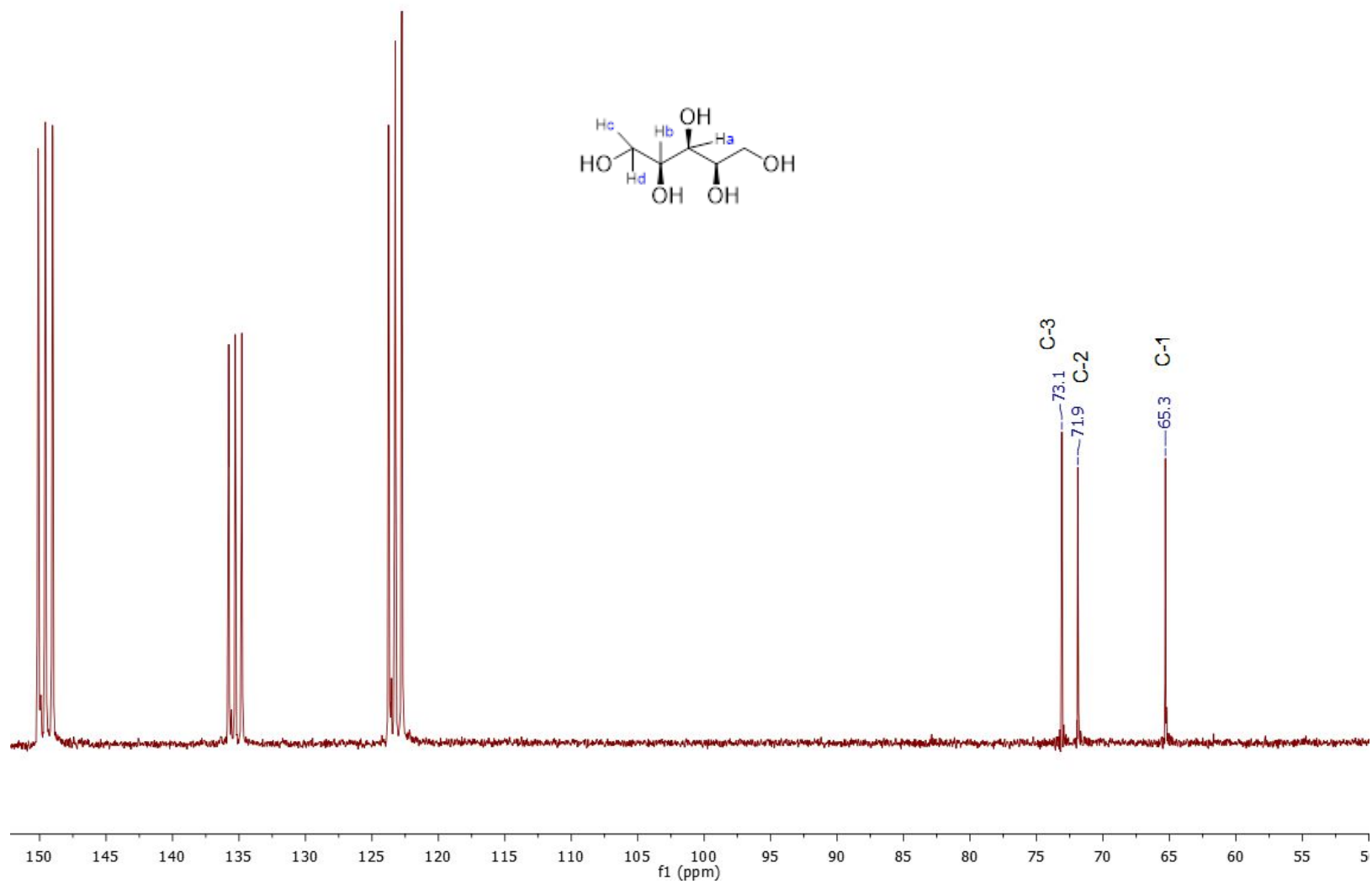
**Espectro 7.** RMN HSQC  $\alpha$ -Tocoferol (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



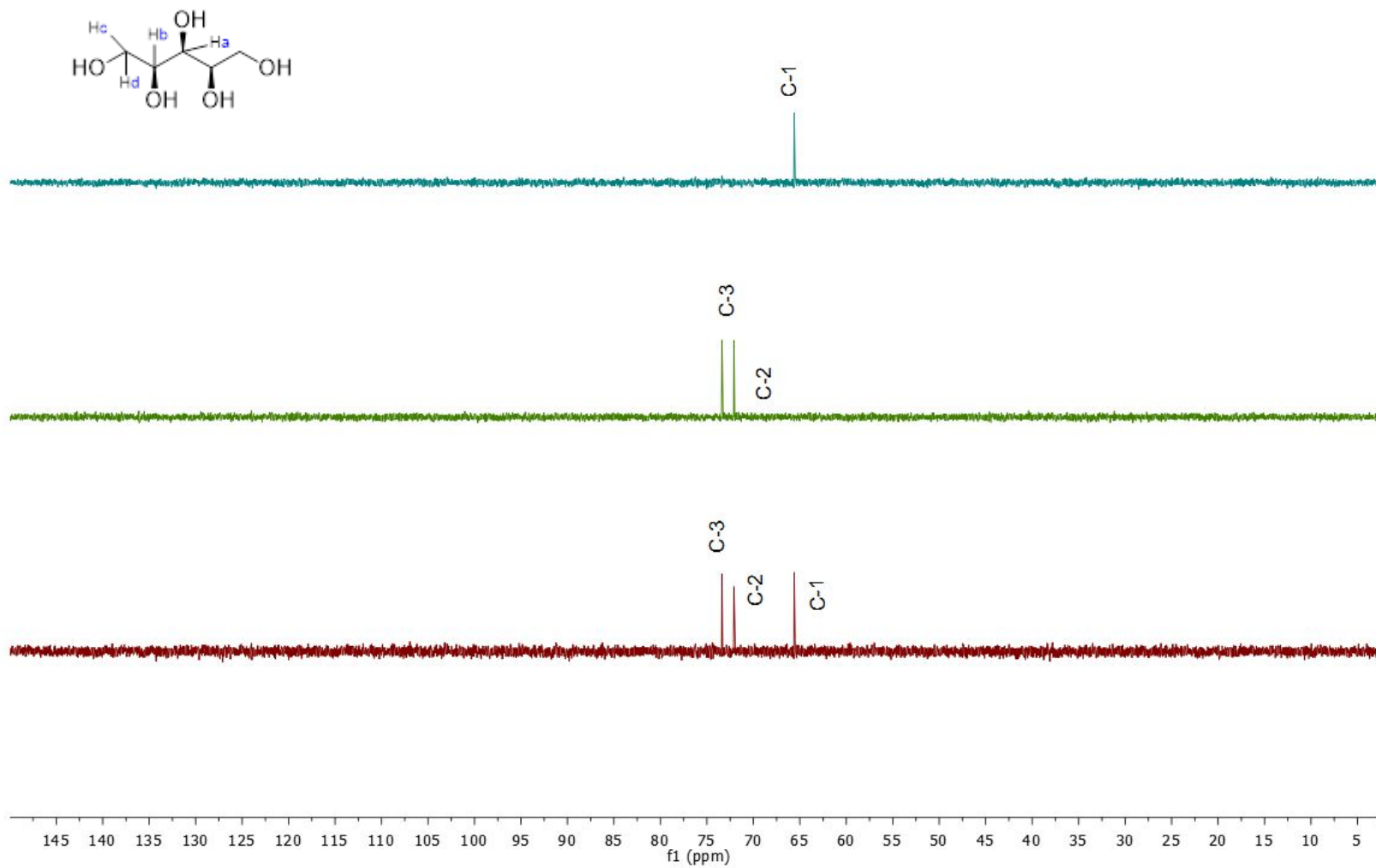
**Espectro 8. RMN HMBC  $\alpha$ -Tocoferol (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**



**Espectro 9.** RMN <sup>1</sup>H Glucitol (500 MHz, Piridina-d5)



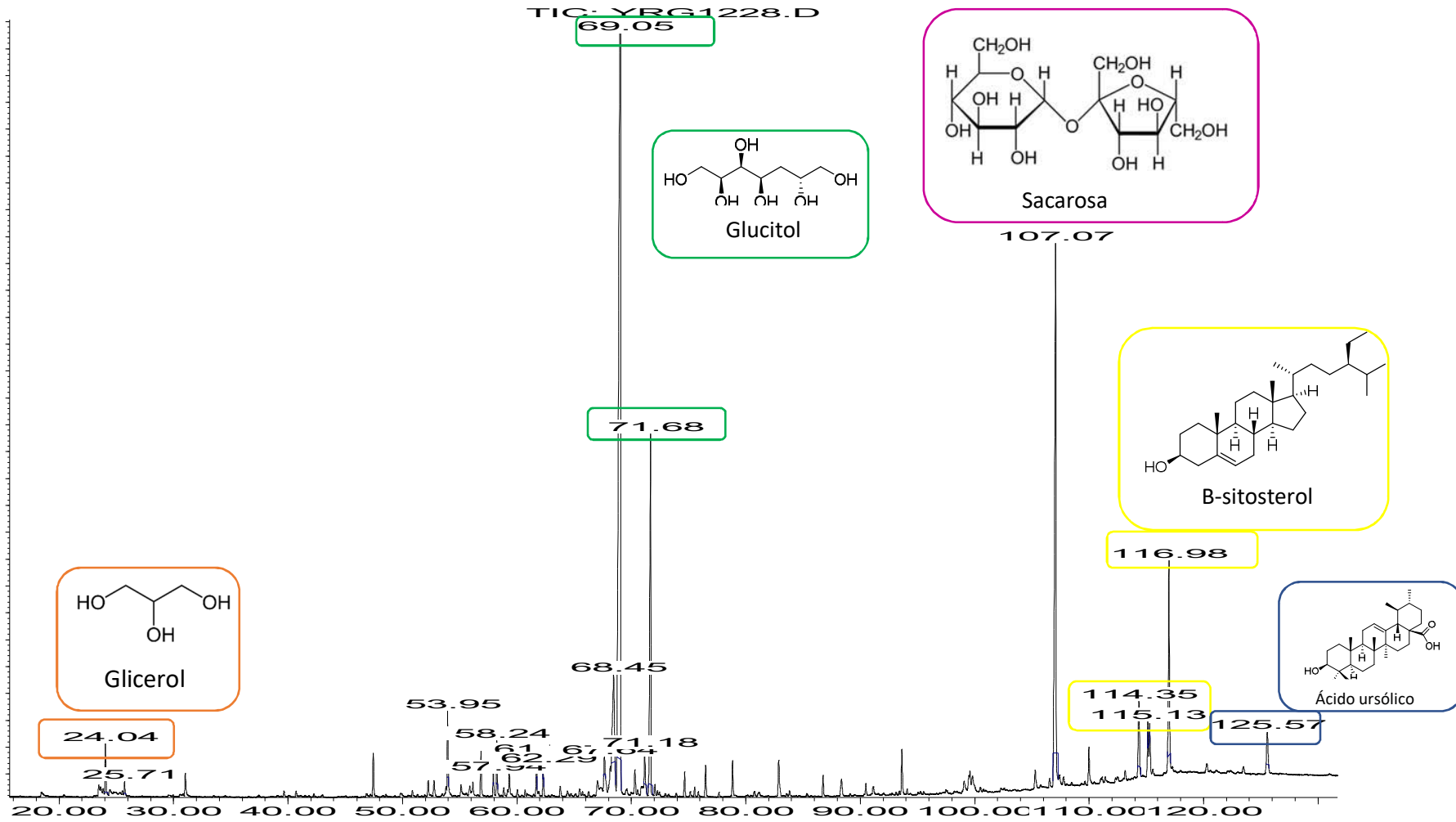
**Espectro 10.** RMN  $^{13}\text{C}$  Glucitol (500 MHz, Piridina-d5)



**Espectro 11.** RMN DEPT Glucitol (500 MHz, Piridina-d5)

Abundance

5800000  
5600000  
5400000  
5200000  
5000000  
4800000  
4600000  
4400000  
4200000  
4000000  
3800000  
3600000  
3400000  
3200000  
3000000  
2800000  
2600000  
2400000  
2200000  
2000000  
1800000  
1600000  
1400000  
1200000  
1000000  
800000  
600000  
400000  
200000



Time-->

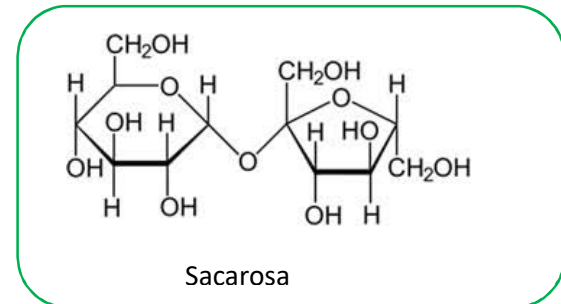
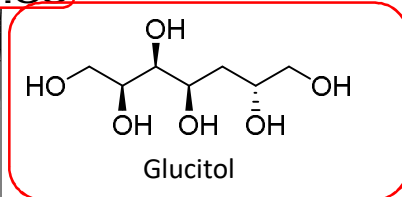
Cromatograma 1. Extracto acetónico

Abundance

TIC: YRG1229.D

1.4e+07  
1.3e+07  
1.2e+07  
1.1e+07  
1e+07  
900000  
800000  
700000  
600000  
500000  
400000  
300000  
200000  
100000

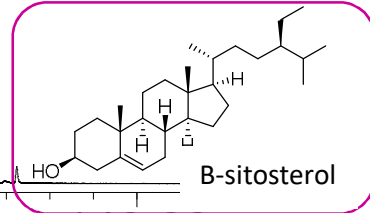
69.61  
72.33



68.17

109.68

106.12  
108.24  
112.99



20.00 40.00 60.00 80.00 100.00 120.00 140.00

Time-->

Cromatograma 2. Extracto metanólico



## 10.BIBLIOGRAFÍA

1. García, A. A. & Carril, E. P.-U. Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA (Biología)* **2**, 119–145 (2011).
2. Bremer, B. & Eriksson, T. Time Tree of Rubiaceae: Phylogeny and Dating the Family, Subfamilies, and Tribes. *International Journal of Plant Sciences* **170**, 766–793 (2009).
3. Journal, I. Time Tree of Rubiaceae : Phylogeny and Dating the Family , Subfamilies , and Tribes Author ( s ): Birgitta Bremer and Torsten Eriksson Reviewed work ( s ): Source : International Journal of Plant Sciences , Vol . 170 , No . 6 ( July / August 2009 ) , pp . . **170**, 766–793 (2013).
4. Inouye, H. *et al.* Chemotaxonomic studies of rubiaceous plants containing iridoid Glycosides. *Phytochemistry* **27**, 2591–2598 (1988).
5. Haque, E.; Kikuchi, T.; Kanemitsu, K.; Tsuda, Y. The Constituents of *Gardenia jasminoides* Geniposide and Genipin-gentiobioside. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **34**, 430–433 (1986).
6. Inouye, H., Takeda, Y. & Nishimura, H. Two new iridoid glucosides from *Gardenia jasminoides* fruits. *Phytochemistry* **13**, 2219–2224 (1974).
7. scholar.
8. Rubiaceae, R. P. *et al.* NEW CYTOTOXIC DITERPENES FROM RONDELETIA PANAMENSIS (RUBIACEAE)". (1979).
9. Sanchez X.A. Dominguez, M. J. J. Diterpenes from *Hoffmannia strigillosa*. *Phytochemistry* **29**, 3587–3590 (1990).
10. M. B. Gupta, R. Nath, N. Srivastava, K. Shanker, K. K. and K. P. B. Anti-Inflammatory and Antipyretic Activities of B-sitosterol. *Medicinal plant resarch* **39**, (1980).
11. Lmi, W. H. H. N. AN EXAMINATION OF THE RUBIACEAE OF HONG KONG-II.\* THE OCCURRENCE OF TRITERPENOIDS AND STEROIDS FROM HED YOTIS ACVTANGULA CHAMP. **57**, 333–335 (1964).
12. R. T. Aplin, W. H. Hui, C. T. H. and C. W. Y. The Structure of Spinosic Acid A, a New Triterpenoid Sapogenin from *Randia spinosa* (Thunb.) Poir. *Journal of the chemical society C: Organic* **V**, 1067–1069 (1968).

13. Hein, C. & Wunderer, H. Pomol- und Pomonsaure. **1265**, 1252–1265 (1967).
14. Anjaneyulu, V., Harischandra Prasad, K., Ravi, K. & Connolly, J. D. TRITERPENOIDS FROM RANDI, DUMETORUM. *Phytochemistry* **28**, 1471–1477 (1989).
15. Hui, W.-H. & Li, M.-M. Triterpenoids and sterols from the stems of *Hedyotis acutangula*. *Phytochemistry (UK)* (1977).
16. Ruo, T.-I., Kakisawa, H., Chen, Y. P. & Hsu, H. Y. Terpenoids from *Elaeagnus oldahmi*. *Phytochemistry* (1976).
17. Wang, T. *et al.* Traditional uses , botany , phytochemistry , pharmacology and toxicology of *Panax notoginseng* ( Burk .) F . H . Chen : A review. *Journal of Ethnopharmacology* **188**, 234–258 (2016).
18. R. AQUINO, F. DE SIMONE, C. P. Plant metabolites. Structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *uncaria tomentosa* and *guettarda platypoda*. *Journal of Natural Products* **52**, 679–685 (1989).
19. RIZK, A. M. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **94**, 293–326 (1987).
20. Banerji, N. Structure of two new saponins from stem bark of *Anthocephalus cadamba* MIQ. *Journal* (1978).
21. Rachel Mata, Lizeth Rios, M'. Del Rayo Camacho, T. R. y D. L. Triterpenes from *Cigarrilla mexicana*. **17**, 12–14 (1986).
22. Haque, E.; Kikuchi, T.; Kanemitsu, K.; Tsuda, Y. Studies on the Constituents of Medicinal and Related Plants in Sri Lanka. I. New Triterpenes from *Hedyotis lawsoniae*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **34**, 430–433 (1986).
23. Moreland, C. G., Philip, A. & Carroll. Carbon- 13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Cinchona Alkaloids. *Journal of Organic Chemistry* **39**, 2413–2416 (1974).
24. Hahn, F. E. Antibiotics. *Springler-Verlag, New York* (1979).
25. Muhtadi, F. J., Loutfy, M. A. & Hassan, M. M. A. *Quinine hydrochloride*. **12**, (1983).
26. Lambertox, A. & Johns, R. ANTIRHINE, A NEW INDOLE ALKALOID FROM ANTIRHEA PUTAIMIHT OSA BAIL. (FAMILY RUBIACEAE). *Australian Journal of Chemistry* **7**, 1463–1471 (1967).

27. Johns, S. R., Lambertson, J. A., & Occolowitz, J. L. Alkaloids from S. American species of Uncaria (Rubiaceae). *J. Pharm. Pharmac.* **26**, 1974 (1974).
28. Akiskal, H. S. Anxiety: Definition, relationship to depression, and proposal for an integrative model. (1985).
29. Macgillivray, S. *et al.* Primary care Efficacy and tolerability of selective serotonin reuptake. 1–6
30. Zhang, Z. J. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sciences* **75**, 1659–1699 (2004).
31. Pollier, J. & Goossens, A. Oleanolic acid. *Phytochemistry* **77**, 10–15 (2012).
32. Zhang, Y. *et al.* Ursolic Acid plays a Role in *Nepeta sibthorpii* Benthams CNS Depressing Effects. *Angiogenesis* **1213**, 1205–1213 (2009).
33. MacHado, D. G. *et al.* Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: Evidence for the involvement of the dopaminergic system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **103**, 204–211 (2012).
34. Colla, A. R. S. *et al.* Serotonergic and noradrenergic systems are implicated in the antidepressant-like effect of ursolic acid in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **124**, 108–116 (2014).
35. Colla, A. R. S., Rosa, J. M., Cunha, M. P. & Rodrigues, A. L. S. Anxiolytic-like effects of ursolic acid in mice. *European Journal of Pharmacology* **758**, 171–176 (2015).
36. Seebacher, W., Simic, N., Weis, R., Saf, R. & Kunert, O. Complete assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR resonances of oleanolic acid, 18 $\alpha$ -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry* **41**, 636–638 (2003).
37. Miranda Sanchez Diter Augusto, R. G. M. Y. ‘Estudio fitoquímico de *Zanthoxylum affine* Kunth y evaluación preliminar de su actividad neuroprotector’. (2017).
38. Mohamad Aris Mohd Moklas, Noor Azuin Suliman, Che Norma Mat Taib & Mohamad Taufik Hidayat Baharuldin. Sedative, Cognitive Impairment and Anxiolytic Effects of Acute *Mitragyna Speciosa* in Rodents. *Sedative, Cognitive Impairment and Anxiolytic Effects of Acute Mitragyna Speciosa in Rodents* **10**, (2013).
39. Younos, C. *et al.* Analgesic and behavioural effects of *Morinda citrifolia*. *Planta*

- Medica* **56**, 430–434 (1990).
40. Martínez, A. L. *et al.* Neuropharmacological effects of an ethanol extract of the *Magnolia dealbata* Zucc. leaves in mice. *Journal of Ethnopharmacology* **106**, 250–255 (2006).
  41. Kamei, J., Ohsawa, M., Tsuji, M., Takeda, H. & Matsumiya, T. Modification of the effects of benzodiazepines on the exploratory behaviors of mice on a hole-board by diabetes. *Japanese Journal of Pharmacology* **86**, 47–54 (2001).
  42. Ramos, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends in Pharmacological Sciences* **29**, 493–498 (2008).
  43. Bourin, M., Petit-Demoulière, B., Nic Dhonnchadha, B. & Hascöet, M. Animal models of anxiety in mice. *Fundamental and Clinical Pharmacology* **21**, 567–574 (2007).
  44. Rodgers, R. J., Dalvi, A. & Anxiety, A. D. Anxiety, Defence and the Elevated Plus-maze Elevated plus-maze Anxiety Ecological validity Ethology Defence Risk assessment Behavioural specificity Muscimol GABA Rodents. **21**, 801–810 (1997).
  45. Sk, P. *et al.* Neuropharmacological effects of triterpenoids. **4**, 354–372 (2013).
  46. Khan, I., Karim, N., Ahmad, W., Abdelhalim, A. & Chebib, M. GABA-A Receptor Modulation and Anticonvulsant, Anxiolytic, and Antidepressant Activities of Constituents from *Artemisia indica* Linn. **2016**, (2016).
  47. Jeon, S. J. *et al.* Ursolic acid enhances pentobarbital-induced sleeping behaviors via GABAergic neurotransmission in mice. *European Journal of Pharmacology* **762**, 443–448 (2015).
  48. Hascoët, M. & Bourin, M. The mouse light-dark box test. *Neuromethods* **42**, 197–223 (2009).
  49. Flint, J. Animal models of anxiety and their molecular dissection. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **14**, 37–42 (2003).
  50. Verano, J., González-Trujano, M. E., Déciga-Campos, M., Ventura-Martínez, R. & Pellicer, F. Ursolic acid from *Agastache mexicana* aerial parts produces antinociceptive activity involving TRPV1 receptors, cGMP and a serotonergic



synergism. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **110**, 255–264 (2013).