

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

**Efecto sedante del extracto alcohólico de hojas y flores de
Melissa officinalis “Toronjil” MAS Matricaria
chamomilla “Manzanilla” sobre la ansiedad inducida en
ratones albinos**

TESIS

**Para optar al Grado Académico de Magister en Farmacología con
mención en Farmacología Experimental**

AUTOR

Jesús Pedro Buendía Ochoa

ASESOR

Jorge Luis Arroyo Acevedo

Lima – Perú

2015

DEDICATORIA

A Dios y a Jesucristo su Hijo Nuestro Señor

Todo lo puedo en Cristo que me fortalece
Filipenses 4, 13

A mis queridos Padres: Tereza y Epifanio, y a mi estimada Familia.

Por su paciencia y por siempre estar a mi lado en los momentos difíciles,
iluminando mis días.

A mi maestro, asesor y amigo, Dr Jorge Luis Arroyo Acevedo

Por sus valiosas enseñanzas y apoyo incondicional, motivador para mi
espíritu investigador.

ÍNDICE

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	
1.1 Situación Problemática	1
1.2 Formulación del Problema	2
1.3 Justificación Teórica	2
1.4 Justificación Práctica	3
1.5 Objetivos	4
1.5.1. Objetivo General	4
1.5.2. Obejetivos Específicos	4
CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO	
2.1. Marco Filosófico	5
2.2 Antecedentes del Problema	7
2.3 Bases Teóricas	21
2.4 Definición de Términos	36
CAPITULO 3: METODOLOGÍA	
3.1 Tipo y Diseño de Investigación	39
3.2 Unidad de Análisis	40
3.3 Población de Estudio	40
3.4 Tamaño de Muestra	40
3.5 Selección de Muestra	40
3.6 Técnicas de Recolección de Datos	41
CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Resultados	50
4.2 Discusión	69
CONCLUSIONES	76
RECOMENDACIONES	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura N° 1

Porcentaje de animales protegidos frente a la inducción de hiperactividad de cambios conductuales con NMDA (N-metil-D-aspartato).

Figura N° 2

Tiempo expresado en minutos de los episodios de hiperactividad y cambios conductuales, producidos por la administración de NMDA y antagonizadas por DAP7 y EAMM.

Figura N° 3

Dosis efectiva media del EAMM sobre la hiperactividad y los cambios conductuales inducidos con NMDA.

Figura N° 4

Tiempo de dormir en minutos, comparado con el estándar farmacológico Diazepam 50 mg/Kg.

Figura N° 5

Porcentaje de hipnosis (Tiempo de dormir), comparado con el estándar farmacológico diazepam.

Figura N° 6

Tejido cerebral, sin alteraciones. Solución Twen 80. (40x).

Figura N° 7

Tejido cerebral, estructuras celulares conservadas. EAMM. (40X).

Figura N° 8

Bazo, sin alteraciones. Solución Twen 80. (40X).

Figura N° 9

Bazo, estructuras celulares conservadas. EAMM. (40X).

Figura N° 10

Corazón, sin alteraciones. Solución Twen 80. (40X).

Figura N° 11

Corazón, estructuras celulares conservadas. EAMM. (40X).

Figura N° 12

Hígado, sin alteraciones. Solución Twen. (40X).

Figura N° 13

Hígado, estructuras celulares conservadas. EAMM. (40X).

Figura N° 14

Pulmón, sin alteraciones. Solución Twen 80. (40X).

Figura N° 15

Pulmón, estructuras celulares conservadas. EAMM. (40X).

Figura N° 16

Riñón, sin alteraciones. Solución Twen 80. (40X).

Figura N° 17

Riñón, estructuras celulares conservadas. EAMM. (40X).

Figura N° 18

Niveles de urea en plasma de ratas normales luego de 60 días de administración de solución Twen 80, 5mL/Kg. y de EAMM 4 g/Kg.

Figura N° 19

Niveles de TGP en plasma de ratas normales luego de 60 días de administración de Solución Twen 80, 5mL/Kg. y de EAMM, 4 g/Kg.

Figura N° 20

Niveles de colesterol en plasma de ratas normales luego de 60 días de administración de solución Twen 80, 5mL/Kg. y de EAMM, 4 g/Kg.

Figura N° 21

Niveles de HDL en plasma de ratas normales luego de 60 días de administración de solución Twen 80, 5mL/Kg. y de EAMM, 4 g/Kg.

RESUMEN

Introducción: Ansiedad enfermedad del milenio, el cual requiere tratamiento para evitar trastorno mayores. **Objetivo:** Determinar efecto sedante de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre ansiedad inducida en ratones albinos. **Diseño:** Experimental. **Lugar:** Facultad de Medicina y Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. **Material Biológico:** ratones, ratas albinos. **Intervenciones:** Treintais ratones fueron inducidos a hiperactividad y/o cambios conductuales por NMDA, considerándose grupos 1) SSF 10 mL/kg; 2) NMDA 75 mg/kg; 3, 4, 5) NMDA + Extracto 1, 2, 4 g/Kg correspondientemente, y 6) NMDA + DAP-7 antagonico del NMDA 0.33 nmol/kg; observándose hiperactividad, cambios conductuales, periodo latencia en minutos y porcentaje de protección. Se comparó el efecto sedante con diazepam en 30 ratones: 1) SSF 10 mL/kg; 2) diazepam 50 mg/kg; 3, 4, y 5) Extracto 1, 2, 4 g/kg respectivamente, midiéndose tiempo de dormir (minutos). Se realizó el estudio de estudio de toxicidad crónica a 60 días en 20 ratas divididos en 4 grupos: 1, 2 blanco control 3, 4, (extracto alcohólico) a dosis de 4 g/Kg. por vía oral, se evaluó los niveles tóxicos determinando a nivel, Bioquímicos: urea, colesterol, transaminasas, lipoproteína HDL e histología. **Resultados:** Los compuestos fenólicos y terpenoídes estuvieron en mayor cantidad en el extracto alcohólico; el 100% ($p < 0.05$) de ratones mostró efecto sedante; los hallazgos hematológicos, bioquímicos se encontraron dentro de los límites aceptados; e histopatológicamente no hubo evidencia de cambios morfológicos. **Conclusiones:** El extracto alcohólico de hojas y flores de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” es sedante en ratones, y sin toxicidad en ratas.

Palabras clave: Extracto alcohólico, sedación, plantas medicinales, NMDA, diazepam, DAP-7

ABSTRACT

Introduction: Anxiety millennium illness requires treatment to prevent further disorder. Objective: To determine the sedative effect of *Melissa officinalis* "Toronjil" *Matricaria chamomilla* more "Manzanilla" on anxiety induced in albino mice. **Design:** Experimental. **Location:** Faculty of Medicine and Faculty of Pharmacy and Biochemistry of the Mayor national university, San Marcos. **Biological Material:** Mice, albino rats. **Interventions:** 36 mice were induced hyperactivity and / or behavioral changes by NMDA, considering groups 1) SSF 10 mL / kg; 2) NMDA 75 mg / kg; 3, 4, 5) NMDA + Extract 1, 2, 4 g / Kg correspondingly, and 6) NMDA antagonist + DAP NMDA-7 0.33 nmol / kg; observed hyperactivity, behavioral changes, latency period in minutes and percentage of protection. Was compared the sedative diazepam in 30 mice: 1) SSF 10 mL / kg; 2) diazepam 50 mg / kg; 3, 4, and 5) Extract 1, 2, 4 g / kg, respectively, measured sleep time (minutes). Chronic toxicity study it has been made 60 days in 20 rats divided into 4 groups: 1, 2 white handle 3, 4, (alcoholic extract) at a dose of 4 g / kg., urea, cholesterol, transaminases, lipoprotein HDL and the histology: toxic levels by orrally determining a level Biochemicals evaluated. **Results:** The phenolic and terpenoid compounds were more abundant at the alcoholic extract; 100% ($p < 0.05$) in mice showed sedative effect; hematological findings, biochemical were within accepted limits; and histopathologically there was evidence of morphological changes. **Conclusions:** The alcoholic extract of leaves and flowers of *Melissa officinalis* "Toronjil" *Matricaria chamomilla* more "Manzanilla" is sedative in mice without toxicity in rats.

Keywords: Alcoholic extract, sedation, medicinal plants, NMDA, diazepam, DAP-7

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Situación problemática:

Las enfermedades y los trastornos mentales tales como: ansiedad y depresión son frecuentes en Estados Unidos, Canadá y México; los pacientes que lo adolecen presentan: cefalea, dolor muscular, dolor de espalda y fatiga, que son componentes de ansiedad. (Virues, 2005) La epidemiología en el Perú confirma los hallazgos de otros países que hasta el 37 % de la población tiene la probabilidad de ansiedad y depresión alguna vez en su vida. La prevalencia de ansiedad en Lima Metropolitana es de 18,2%, en la sierra peruana de 16,2% y en la selva 21,4%. (Rondón, 2006) Las patologías aludidas sin tratamiento y no atendidas, así como el alto nivel de sentimientos negativos tienen como resultado que: 1 % de las personas en Lima Metropolitana (IESM HD-HN; 2002) el 0,7% en la sierra (IESM HD-HN; 2003) y 0,6% en la selva (IESM HD-HN; 2004) estén predispuestas a intentos suicidas. En la actualidad la triada ansiedad, depresión y estrés está causando más muertes que el cáncer y el SIDA juntos. (Manelic, 1995).

Actualmente se dispone de drogas tranquilizantes como: diazepam, midazolam, etc.; que están indicados para el tratamiento de la ansiedad, debido a la necesidad de seguir encontrando alternativas para el tratamiento de la ansiedad, se han buscado a través de datos etnomédicos, plantas medicinales que puedan tener, actividad sedante e identificar sus metabolitos implicados en el efecto terapéutico. Dentro de este grupo de plantas, en la medicina tradicional peruana, se reconoce a las hojas y flores de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” y a *Melissa officinalis* “Toronjil” como agentes tranquilizantes, sedantes, digestivos, carminativos y antiespasmódicos, (Kuklinski, 2003). Debido a la presencia de compuestos polifenólicos y terpenos, ambos con diferente estructura química.

1.2 Formulación del problema:

¿La administración vía oral del extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” tiene efecto sedante sobre la ansiedad inducida en ratones albinos?

1.3 Justificación teórica

Los estudios realizados representan muchos estados posibles que presenta la actividad cerebral como el sueño, la vigilia, la excitación extrema, e incluso los diversos estados de ánimo de una persona entre ellos la euforia, la depresión, la ansiedad y el miedo. Cualquiera de estos estados obedece a distintas fuerzas activadoras o inhibidoras generadas normalmente en el propio encéfalo; la estimulación de diversas zonas específicas del encéfalo puede producir sueño dotado de unas características próximas a la del sueño natural. (Domínguez, 1998).

Desde tiempos inmemoriales los pueblos atesoran en su cultura médica el conocimiento de las propiedades curativas de muchas plantas. Tal es el caso de “Toronjil” y “Manzanilla”, que crece en nuestro territorio y a los cuales se les atribuye propiedades sedantes. (Bruneton, 2003). El toronjil identificado como *Melissa officinalis* Fam. Lamiaceae. La manzanilla identificada como *Matricaria chamomilla* Fam. Asteraceae. (Kuklinski, 2003).

La administración de *Melissa officinalis* está indicado como un sedante central, ya que atenúa los síntomas y desordenes nerviosos, incluyendo los estados de hiperexcitabilidad, en estados de preocupación y estrés. (Kommissiom E Monograph, 1984; Bisset and Wichtl, 1994). Estudios específicos, mencionan propiedad sedante, proporcionando calma, efecto anti-agitación realizados en ratones donde se observó reducción de los movimientos espontáneos, luego de la administración del aceite esencial de *Melissa officinalis* y en el extracto aislado de terpenos. (Wagner and Sprinkemeyer, 1973).

Las propiedades farmacológicas de *Matricaria chamomilla*, incluida; antiinflamatorio, antiséptico, carminativo, sedante y espasmolítico. (Salamon et al, 1992). Donde están identificados más 120 compuestos químicos, en *Matricaria chamomilla* en los cuales se encuentran metabolitos secundarios: son 28 terpenos, 36 flavonoides y 52 compuestos que poseen el efecto de potenciar los efectos farmacológicos antes aludidos depresor del SNC. (Mann et al, 1992).

Habiéndose encontrado estudios individuales del efecto sedante y depresor del SNC para cada planta; es por ello que en la presente investigación ha buscado evaluar, si dicho efecto sedante se potencia si se asocia ambas plantas en estudio.

1.4 Justificación práctica

El presente estudio aporta información nueva y relevante sobre el conocimiento de las propiedades beneficiosas que brinda la administración vía oral del extracto alcohólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” más *Melissa officinalis* “Toronjil” que ejerce efecto sedante sobre la ansiedad inducida en ratones albinos, a fin de contribuir con una alternativa para mejorar estados de ansiedad en la población.

El presente estudio es el primero en realizarse en nuestro país respecto a la asociación de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” más *Melissa officinalis* “Toronjil” con propiedades sobre la ansiedad, aun cuando existen trabajos similares pero individuales de cada planta. Nuestros resultados pueden permitir demostrar si al asociar estas 2 plantas sujetas a estudio, tienen mejores respuestas a dosis establecidas con respecto a ser administradas individualmente.

En la práctica, los resultados encontrados en esta investigación fundamentarían realizar recomendaciones a nivel local y nacional respecto a un tratamiento alternativo para la terapia de la ansiedad, valorando además el costo/beneficio que pueda implicar el uso de terapias tradicionales.

1.5 Objetivos de la investigación

1.5.1. Objetivo general

- Demostrar el efecto sedante del extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre la ansiedad inducida en ratones albinos.

1.5.2. Objetivos específicos

- Realizar el estudio fitoquímico preliminar del extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla”.
- Evaluar el efecto sedante del extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre la ansiedad inducida en ratones albinos, estableciendo la dosis efectiva 50 ansiolítica.
- Determinar si la administración del extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” presenta efecto sedante en comparación con el estándar farmacológico en la ansiedad inducida en ratones albinos.
- Determinar la seguridad del extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” a nivel hematológico, bioquímico y anatomopatológico al ser administrado por vía oral en ratas normales durante 60 días.

CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Marco filosófico

Se trata de una investigación cuantitativa con fundamento positivista, porque se trata de un sistema filosófico que admite únicamente el método experimental y rechaza toda noción a priori; y todo concepto universal y absoluto. Esta doctrina comprende no solo una teoría de la ciencia sino también una reforma de la sociedad; y debe ser una regla de vida para el hombre (Comte, 1973).

El nerviosismo es un estado de excitación del sistema nervioso, que surge por una causa justificable o no; la ansiedad, por su parte es una emoción indeseada e injustificada, cuya intensidad no guarda ninguna proporción con la posible causa que lo provoca. La ansiedad no es igual al miedo, pues este implica la presencia de un peligro real conocido. No obstante, las reacciones de ansiedad pueden alcanzar niveles excesivamente altos o pueden ser poco adaptativas en determinadas situaciones. En este caso la reacción deja de ser normal y se considera patológica. (Sevillano, 2003).

La mayoría de los tratamientos psicofarmacológicos empleados en la actualidad por la psiquiatría actúan químicamente sobre los sistemas de neurotransmisión tratando de regular, la actividad de determinadas áreas del sistema nervioso implicadas en el trastorno que se desea tratar. En el tratamiento de la ansiedad, se emplean habitualmente dos tipos de fármacos: los ansiolíticos, y los antidepresivos, con consecuencias expresadas en reacciones o eventos adversos. (De Lope, 2007).

La presente investigación está relacionada con el tipo de medicina tradicional, específicamente la medicina alternativa. Por medicina alternativa se considera al conjunto de disciplinas terapéuticas y diagnósticas que existen fuera de las instituciones del sistema de salud convencional. El uso actual de esta 'clase' de medicina está muy extendido, tanto en el mundo industrial como el preindustrial. Parte del creciente uso de las terapias

alternativas se debe a su reciente validación profesional; muchos textos de divulgación general claman y justifican su uso, basándose en información académica no necesariamente de rigor científico. En este ensayo, se analizará la evidencia científica disponible, así como también se analizará las bases lógicas y filosóficas de la medicina en cuestión (Peña, et al., 2007).

Aunque existen otras alternativas terapéuticas para el tratamiento de la ansiedad, no fue tema de investigación, pero se da un comentario. La homeopatía es una forma de medicina complementaria/alternativa y se promueve por ser una forma segura y eficaz de tratamiento para niños y adultos. La homeopatía es un sistema de medicina basada en el principio de tratar "lo similar con lo similar" con diversas diluciones de sustancias naturales o producidas por el hombre. La homeopatía se centra en las características únicas de experiencia y sintomatología de cada paciente y usa esta información para determinar la prescripción apropiada para cada paciente. (Thomas 2004).

2.2 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Mrlianová, et al, en, 2002, en Republica Checa, al investigar el contenido del aceite esencial de *Melissa officinalis* y su relación entre las concentraciones de sus componentes químicos, respecto a las formas de recolección, en “The influence of the harvest cut height on the quality of the herbal drugs *Melissae folium* and *Melissae herba*” realizaron estudios sobre *Melissa officinalis*. Teniendo como objetivo identificar los metabolitos presentes en *Melissa officinalis*. La variabilidad en el contenido y la calidad del aceite esencial se observó en la planta entera en función de la altura de corte de la cosecha de melisa (*Melissa officinalis*). Tres cortes diferentes se llevaron a cabo en las plantas respectivas. El contenido de aceite esencial, era más alta en el tercio superior (0,13%), satisfactorio en la planta que incluye tanto la parte superior y tercio medio (0,08%) y más bajo en la planta entera (0,06%). El contenido de aceite en las hojas de las plantas respectivas estuvo en el rango de 0.14% - 0.39%. Además que las muestras recolectadas también presentan: flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, triterpenos, y sesquiterpenos. Es de destacar que la planta también posee en su composición; ácido cafeico, el eugenol, el ácido rosmarínico citronelal y colina. Concluyendo que el cultivo y métodos de recolección tienen una gran influencia en la cantidad de aceite volátil presente en las hojas. Se ha encontrado que el contenido de la concentración del aceite esencial en la planta es más alto en aquellas muestras cortadas en el tercio superior y más baja en los dos tercios inferiores.

Soulimani, et al, en 1991, en Francia; al realizar estudios experimentales en ratones sobre la actividad conductual después de la administración del extracto hidroalcoholico de *Melissa officinalis*, en “Neurotropic Action of the Hydroalcoholic Extract of *Melissa officinalis* in the Mouse” teniendo como objetivo, determinar la reducción de la actividad conductual después de la administración del extracto, evidenciadas por la disminución de los parámetros de comportamiento, utilizando un método de test de escalera, una prueba de medio ambiente familiar y una prueba de ambiente no familiar, además se realizó una prueba de analgesia utilizando el método de

dolor inducido por ácido acético, (ensayo de retorcimiento), El extracto hidroalcohólico de *Melissa officinalis* L. liofilizado (Lamiaceae) ha sido evaluado para efectos de comportamiento en ratones. De acuerdo con el uso tradicional de *M. officinalis*, posee propiedades sedantes confirmadas en dosis bajas por la disminución de los parámetros de comportamiento en una prueba de medio ambiente no familiar (test de escalera) y en una prueba de ambiente familiar (dos pruebas compartimiento). Con dosis altas, la actividad analgésica periférica se obtuvo mediante la reducción del dolor inducida por ácido acético (prueba de retorcimiento); Además, el extracto de la planta inducía sueño en ratones después del tratamiento con una dosis de pentobarbital y potencializa el sueño inducido por la dosis hipnótica de pentobarbital. Concluyendo; que después de la administración del extracto de *Melissa officinalis*, posee propiedades inductoras del sueño con una dosis de pentobarbital, potencializando el sueño inducido por este fármaco, además de poseer efecto analgésico con dosis altas.

Abuhamdah, et al, en 2008, en Inglaterra, en búsqueda de explicar la participación de los receptores GABA y NMDA después de la administración de *Melissa Officinalis* investigaron, en “Pharmacological profile of an essential oil derived from *Melissa officinalis* with anti-agitation properties: focus on ligand-gated channels” un estudio que tiene como objetivo demostrar la participación de los receptores GABA, NMDA y nicotínicos, implicados en la génesis de la ansiedad y la interacción de los compuestos del aceite esencial de *Melissa officinalis*, describiendo el método electrofisiológico unión doble de radioligando, centrándose en una serie de canales iónicos activados por ligando. *Melissa officinalis* inhibió la unión de t-butilbiciclofosforotionato en el encéfalo de rata al canal receptor GABA ácido gamma-aminobutírico (0.040 +/- 0.001 mg/ml), además tuvo efecto sobre NMDA (alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato AMPA) y los receptores nicotínicos de acetilcolina. Los análisis primarios electrofisiológicos de las neuronas corticales de rata han demostrado que *Melissa officinalis* se une de manera reversible en el ensayo de inducción al stress, en una concentración dependiente (0.01- 1 mg/ml), mientras que la inhibición del AMPA o NMDA inducidas también se observó. Curiosamente

Melissa officinalis provocó una reducción dependiente de la dosis en periodos de excitación, con un efecto depresor sobre la neurotransmisión (en contraste con el antagonista de GABA picrotoxinin que provoca episodios de hiperactividad muy intensas en estas células). Concluyendo que *Melissa officinalis* provocó una reducción significativa dependiente tanto en la transmisión inhibitoria y excitatoria, con un efecto depresor sobre la neurotransmisión.

Pereira, et al, en 2005, en Brasil; al realizar estudios acerca de la composición química de muchas plantas a las cuales se les atribuye propiedades como coadyudantes de muchas enfermedades investigó en “Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid” acerca del ácido rosmarínico, que es un compuesto hidroxilado de origen natural. Está presente en muchas plantas, por ejemplo, se produce en *Artemisia capillaris*, *Calendula officinalis*, *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis* y en otras varias familias de plantas. Entre las propiedades que se le atribuye es una serie de actividades biológicas interesantes, por ejemplo, antiviral, antibacteriano, antiinflamatorio y antioxidante a dicho ácido. El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de la administración intraperitoneal de ácido rosmarínico (1, 2, 4 y 8 mg/ kg) en la prueba de, elevada-laberinto, el paso de la evitación a la tarea de campo abierto en ratas. Además, se evaluó su efecto genotóxico, en el tejido cerebral utilizando el ensayo de genotoxicidad. El ácido rosmarínico (2 y 4 mg kg) evidenció, en la correspondiente prueba, una actividad similar a la ansiolítica, cuando se utiliza en dosis bajas, sin afectar a la memoria a corto plazo (STM) y la memoria a largo plazo (LTM). Concluyendo que 8 mg/Kg de este ácido era suficiente para aumentar la motivación y la locomoción de los animales, pero no 1, 2 o 4 mg/kg, lo que sugiere que en dosis bajas, este compuesto puede producir un efecto de tipo ansiolítico sin ejercer alteraciones locomotoras o daño del ADN en el tejido cerebral.

Aoshima y Hamamoto, en 1999, en Japón, realizaron estudios acerca de la potenciación de los receptores GABA expuestos a estímulos como la aromaterapia, en “Potentiation of GABA A receptors expressed in Xenopus

oocytes by perfume and phytoncid” cuyo objetivo es demostrar la interacción de muchos compuestos entre ellos Citral que se encuentra presente en *Melissa officinalis* interactúa con el receptor GABA, utilizando métodos de mediciones electrofisiológicas de cerebros de ratas. Para estudiar los efectos de perfume sobre los receptores GABA, los receptores ionotrópicos GABA A presentes en *Xenopus*. Fueron mediante la inyección de ARNm en cerebro de rata. El aceite esencial, fragancia y tales phytoncid, el alcohol de hojas, hinokitiol, pineno, eugenol, citronelol citronelal potencian la respuesta en presencia de GABA A bajas concentraciones (10 y 30 uM), posiblemente debido a que se unen a la potenciación de sitio en los receptores GABA A y poseen aumento de la afinidad a los receptores del GABA. Dado que se sabe que la potenciación de los receptores GABA A por las benzodiazepinas, barbitúricos, esteroides y anestésicos induce el efecto ansiolítico, anticonvulsivante y la actividad sedante o efecto anestésico. Estos resultados concluyen y sugieren la posibilidad de que la exposición a perfume o phytoncid través de los pulmones y la piel, modula la transmisión neuronal en el cerebro a través de receptores ionotrópicos GABA-A y cambia la estructura de la mente humana, como lo hace el alcohol o el tabaco.

Salah y Jager, en 2005, en Dinamarca, propusieron con sus estudios *in vitro*, que se han evidenciado que *Melissa officinalis*, es un débil inhibidor de la acetilcolinesterasa y tiene una afinidad moderada al receptor de benzodiazepina GABA-A en “Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities” mencionado estudio tuvo como objetivo demostrar la interacción de los componentes de *Melissa officinalis* sobre los receptores GABA-A, con un método de estudio *in vitro*; inhibición de la acetilcolinesterasa, la afinidad para el sitio de benzodiazepina GABA-A y para el transportador de serotonina. En las últimas décadas el uso de la medicina tradicional en el Líbano se ha incrementado. Extractos acuosos, etanólicos y de acetato de etilo de siete plantas de que se utilizan tradicionalmente para los trastornos neurológicos a la enfermedad de Alzheimer, la epilepsia y los trastornos afectivos como la depresión fueron probados para la inhibición de la acetilcolinesterasa y afinidad al sitio GABA-benzodiazepina y para el transportador de serotonina. Extractos de acetato

de etilo de *Salvia triloba*, *Lavandula officinalis*, *Origanum* y *Artemisia herba-alba syriacum*. Se exhibe débil actividad de la acetilcolinesterasa en el ensayo. Ninguna de las plantas estaba activos en el ensayo de transportador de serotonina. Un extracto etanólico de *Artemisia herba-alba* tenía buena afinidad para el sitio receptor GABAA-benzodiazepina; extractos etanólicos de *Melissa officinalis* y *Salvia triloba* tenían actividad moderada. Concluyendo que el extracto etanólico de *Melissa officinalis* posee afinidad moderada sobre los receptores GABA.

Kennedy, et al, en 2003, en Inglaterra, al proponer que algunos receptores estarían interactuando después de la exposición a los componentes de ciertas plantas medicinales, realizaron estudios en “Modulation of Mood and Cognitive Performance Following Acute Administration of Single Doses of *Melissa Officinalis* (Lemon Balm) with Human CNS Nicotinic and Muscarinic Receptor-Binding Properties, teniendo como objetivo, demostrar la participación de los receptores nicotínicos y muscarínicos tras la administración del extracto etanólico de *Melissa officinalis* en individuos sanos; utilizando un método de análisis de unión al receptor nicotínico y muscarínico *in vitro*, un estudio aleatorizado, controlado con placebo, doble ciego, estudio cruzado equilibrado, prepararon el extracto etanólico de hojas secas de *Melissa officinalis* administrándolo a dosis de 600, 1000 y 1600 mg,. *Melissa officinalis*, es una planta medicinal al que se le ha atribuido propiedades tales como que mejoran la memoria, pero que actualmente se encuentra más ampliamente utilizado como un sedante suave y ayuda a dormir. En un estudio previo se demostró que un extracto de Melissa comercial llevado a dosis específicas mejoró los estados de calma, e inhibición en la ejecución de tareas de memoria cronometrada dependientes de la dosis. Sin embargo, el extracto utilizado en el estudio no exhibió propiedades de unión a receptores colinérgicos *in vitro*. (Mantle, et al, 2000).

Concluyendo que no se detectaron propiedades inhibitoras de la colinesterasa. Los efectos cognitivos y del estado de ánimo más notables se han mejorado el rendimiento de memoria y el aumento de “calma” en todos los puntos de tiempo después de la dosis más alta (1600 mg). Sin embargo,

mientras que el perfil de los resultados fue abrumadoramente favorable para la dosis más alta, disminuciones en la velocidad de ejecución de la tarea de memoria cronometrada y en el test de rapidez visual, tarea de procesamiento de información se incrementó con dosis decrecientes. Estos resultados sugieren que las dosis de *Melissa officinalis* por encima del máximo empleado aquí puede mejorar el rendimiento cognitivo y el estado de ánimo y por lo tanto puede ser un valioso complemento en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Los resultados también sugieren que diferentes preparaciones derivadas de las mismas especies de plantas pueden exhibir diferentes propiedades dependiendo del proceso utilizado para la preparación de la muestra.

Kennedy, et al, en 2002, en Inglaterra, al realizar una investigación en búsqueda de evidenciar la acción de mejoría de los estados cognitivos después de la administración del extracto de *Melissa officinalis*, en “Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of *Melissa officinalis* (lemon balm)” un estudio clínico, cuyo objetivo es demostrar la mejora de los estados cognitivos en individuos después de la administración del extracto en estudio; utilizando un método doble ciego cruzado aleatorizado que incluyó a 20 voluntarios jóvenes sanos. En este estudio, el tratamiento con la dosis más baja (300 mg) aumentó autopercepción de 'calma' en 1 hora, mientras que las dosis de 600 mg y 900 mg, produjo efectos significativos en el desempeño de tareas de memoria, observables en ambos 2,5 horas y 4 horas después de la administración. Se encontró que la dosis probada más alta (900 mg) es capaz de reducir significativamente el estado de alerta dentro de 1 hora, lo que sugiere un efecto de dosis-respuesta. Concluyendo que la administración de los extractos en diferentes dosis sujeta a estudio fueron capaces de modular tanto el estado de ánimo y el rendimiento cognitivo en una dosis y tiempo dependiente.

Wake, et al, en 2000, en Inglaterra, llevaron a cabo una investigación para afianzar la participación de los receptores nicotínicos y muscarínicos, dependiente de los componentes de *Melissa officinalis*, ya que a dicha planta

se le atribuye propiedades colinérgicas, el mencionado estudio es “CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal plants traditionally used to improve failing memory” describe que ciertas plantas utilizadas en medicina tradicional como por ejemplo, Lamiaceae y Asteraceae tienen una larga historia de uso en la restauración de las funciones cognitivas perdidas o en declive, por la cual se utiliza mucho en medicina tradicional. Las investigaciones se llevaron a cabo proponiendo como objetivo evaluar la actividad SNC, receptores colinérgicos vinculante en extractos de plantas medicinales entre los que destacan extractos de plantas Lamiaceae y Asteraceae utilizados en Europa para aumentar o restaurar las funciones mentales, incluyendo la memoria. Eran extractos etanólicos preparados a partir de estas plantas y un número de otras especies relacionadas por género, el desplazamiento sobre los receptores colinérgicos, sometidos a nicotina y escopolamina sustancias anticolinérgicas por parte del extracto de *Melissa officinalis* fueron medidos, para esto utilizaron el método de homogenizado de las membranas de las células cerebrales corticales en humanos. Concluyendo, que el desplazamiento por parte del extracto de *Melissa officinalis*, fueron considerablemente alentadores ya que las curvas de desplazamiento fueron comparado con el cloruro de carbamilcolina un análogo de la acetilcolina y esto se debería a la participación de la colina un ligando nicotínico que además se encontró en proporciones considerables en el extracto de *Melissa officinalis*.

Apak, et al, en 2006, en Turquía, buscando explicar las propiedades antioxidantes de muchas infusiones acuosas entre ellas las de *Melissa officinalis*, realizaron un estudio denominado “The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas” manifestando el objetivo de, determinar la capacidad antioxidante de las infusiones sujetas a estudio. La capacidad antioxidante total de los extractos acuosos de algunas plantas utilizadas en medicina tradicional, preparados en infusiones en agua caliente. Estas infusiones fueron analizadas con (neocuproína) cloruro de cobre (II), también conocido como el ion cúprico, observándose la reducción de la capacidad antioxidante de reactivo (CUPRAC), que era fácilmente accesible, rápido, estable y sensible a los

antioxidantes hidrófilicos y lipófilicos. Las capacidades antioxidantes más altas de algunas infusiones de hierbas disponibles en el mercado turco se observaron para *Pimpinella escarlata* (*Anagallis arvensis*), albahaca (*Ocimum basilicum*), té verde (*Camellia sinensis*) y bálsamo de limón (*Melissa officinalis*), en este orden (1.63, 1:18, 01:07, y 0,99 mmol Trolox equivalente (TR) / g, respectivamente). Midiendo la absorbancia frente a los datos de concentración en diferentes diluciones y adiciones estándar de modelo en compuestos antioxidantes (Trolox y quercetina) a base de infusiones de té de plantas medicinales, donde se mostró las absorbancias (a 450 nm del método CUPRAC) debido a los diferentes compuestos antioxidantes en infusiones de té de hierbas son aditivos; es decir, los antioxidantes probados no interactúan químicamente para producir aparentes desviaciones de la ley de Beer. Concluyendo que *Melissa officinalis* posee propiedades antioxidantes considerables.

Ballard, et al, en 2002, en Inglaterra, realizaron estudios acerca de las propiedades del aceite esencial de *Melissa officinalis* en condiciones controladas en "Aromatherapy as a Safe and Effective Treatment for the Management of Agitation in Severe Dementia: The Results of a Double-Blind, Placebo-Controlled Trial With Melissa" para ello utilizaron el estudio doble ciego en condiciones controladas con placebo, 72 personas que residían en el Servicio Nacional de Salud (Reino Unido), que tenían ansiedad clínicamente significativa en el contexto de la demencia severa fueron asignados al azar a la aromaterapia con aceite esencial de Melissa (N = 36) o placebo (aceite de girasol) (N = 36). El tratamiento activo y placebo de aceite se combinó con una loción de base y se aplica a la cara y los brazos de los pacientes dos veces al día por personal de cuidado. Los cambios en la agitación clínicamente significativa, fueron evaluados a través de CMAI (Cohen-Mansfield Agitación Inventario) y la calidad de los índices de vida (porcentaje de tiempo dedicado socialmente retirado y el porcentaje de tiempo dedicado a actividades constructivas, medidos con demencia (Mapeo Care) se compararon entre los dos grupos en un período de 4 semanas de tratamiento. Concluyendo; que los hallazgos de la aromaterapia con aceite de bálsamo esencial de *Melissa officinalis*, es un

tratamiento seguro y eficaz para la ansiedad clínicamente significativo en las personas con demencia severa, con beneficios adicionales para la calidad de los parámetros clave de la vida, e indican la necesidad de ensayos más controlados.

Kennedy, et al, en 2006, en Inglaterra; al comparar los efectos de un extracto asociado de *Melissa officinalis* mas *Valeriana officinalis*, en “Anxiolytic effects of a combination of *Melissa officinalis* and *Valeriana officinalis* during laboratory induced stress”, un trabajo que difiere del nuestro ya que dicho estudio se realizó de manera clínica y con una asociación diferente. En este estudio hacen referencia que en investigaciones recientes han sugerido que después de la administración de *Melissa officinalis*, puede atenuar el estrés inducido en pruebas en el laboratorio. Como las dos plantas mencionadas en este estudio a menudo se venden en combinación o con otros, en este estudio propusieron un objetivo general de demostrar, que la asociación de *Melissa officinalis* más *Valeriana officinalis* ejerce efecto sedante, ansiolítico e hipnótico, durante el estrés inducido en el laboratorio. Utilizaron un estudio doble ciego, controlado con placebo, aleatorizado, en 24 voluntarios sanos que recibieron tres dosis individuales separadas (600 mg, 1.200 mg, 1.800 mg) de un producto estandarizado que contiene extractos de *Melissa officinalis* mas *Valeriana officinalis* en comparación con un placebo, en días separados, por un período de 7 días. La modulación del estado de ánimo y la ansiedad se evaluó durante la pre-dosis 1 h, 3 h y 6 h, y después de la dosis de una versión de 20 minutos de simulación de estrés (DISS). También se evaluó el rendimiento cognitivo. Los resultados mostraron que la dosis de 600 mg de la combinación mejoró los efectos negativos de la DISS en puntuaciones de ansiedad. Sin embargo, la dosis más alta (1800 mg) mostró un aumento en la ansiedad que fue menos marcada pero que alcanzó significancia durante la sesión de pruebas. Además, las tres dosis llevaron a disminuciones en el rendimiento. Concluyendo, que estos resultados sugieren que una asociación de *Melissa officinalis* y *Valeriana officinalis* posee propiedades ansiolíticas que merecen mayor investigación.

Pirzard, et al, en 2006, en Irán, buscando reconocer la composición química del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” en “Essential Oil Content and Composition of German Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) at Different Irrigation Regimes” un estudio que describe como objetivo identificar los componentes presentes en el aceite esencial de *Matricaria chamomilla*, para lo cual emplearon un método de análisis a través de HPLC, cromatografía líquida; el aceite esencial se obtuvo mediante destilación de flor seca y se analizó. Concluyendo que las muestras analizadas contienen en diversas proporciones de flavonoides (incluyendo flavonoles y flavonas metoxilados), apigenina (otros flavonoles son parcialmente hidrolizada a apigenina que conduce a concentraciones de hasta 8%), Apigetrin (apigenina-7-D-glucósido), apigenina-7-acetylglucoside, Apiin (apigenina-7 -apiosylglucosido), rutina (quercetina-3-rutinósido), luteolina, quercimeritina (quercetina-7-D-glucósido), quercetina y isoramnetina. La cumarina, umbeliferona (7-hidroxycumarina) y Herniarina (metil éter de umbeliferona). Proazulenos (lactonas sesquiterpénicas), incluyendo matricin, matricarin y desacetilmatricarin un precursor de camazuleno. Camazuleno (1-15%), farneseno, óxidos de alfa-bisabolol y bisabolol A y B Ácidos vegetales (mucílago ácido), ácidos grasos, polisacáridos, colina, aminoácidos, encontrándose una variación con respecto a los diversos regímenes de irrigación varían, de acuerdo a las diferentes muestras estudiadas.

Shinomiya, et al, en 2005, en Japón, buscando una terapia alternativa que pueda contribuir con los episodios de ansiedad, realizaron estudios acerca de las propiedades de *Matricaria chamomilla* en “Hypnotic activities of chamomile and passiflora extracts in sleep-disturbed rats” un estudio en el que se utilizó, una asociación de extracto a administrar, utilizaron especies de plantas diferentes a las que mostraremos en el presente diseño experimental. Propusieron como objetivo demostrar la capacidad de disminuir el periodo de latencia al sueño en ratas que recibieron el extracto de *Matricaria* y *Passiflora*, utilizando un diseño experimental en ratas con su respectiva medición de encefalograma. Concluyendo que a 300 mg/Kg del extracto de manzanilla disminuyó significativamente el periodo de latencia

del sueño en un modelo de rata de sueño-perturbada, lo que demuestra la actividad de tipo benzodiazepinas.

Della, et al, en 1981, en Italia realizando estudios sinérgicos de varios extractos a los cuales se les atribuyen propiedades sedantes entre ellas Matricaria en “Evaluation of the activity on the mouse CNS of several plant extracts and a combination of them” un estudio que es totalmente diferente del nuestro visto que en el no hacen alusión a *Melissa officinalis*, cuyo objetivo es demostrar el efecto sedante sobre el SNC en ratones de los extractos mencionados; utilizando un diseño experimental en ratones donde midieron las capacidad sedante de los extractos administrados vía oral de las plantas sujetas a estudio. Concluyendo que el extracto de manzanilla mostraron actividad sedante sobre el sistema nervioso central del ratón. La asociación de los siete extractos parecía actuar de una manera sinérgica, la actividad resultante es ser sedantes a alta dosis y ansiolítico a dosis bajas.

Viola, et al, en 1995, en Argentina; realizaron estudios acerca de las propiedades de la medicina tradicional dentro de ellos, las propiedades del extracto de Matricaria en “Apigenin, a Component of *Matricaria recutita* Flowers, is a Central Benzodiazepine Receptors-Ligand with Anxiolytic Effects” un trabajo donde utilizaron como vía de administración la vía intraperitoneal; teniendo como objetivo demostrar la interacción de Apigenina sobre los receptores GABA en ratones. Propusieron un diseño experimental en ratones a los cuales se les administra el extracto de Matricaria en diversas concentraciones por vía intraperitoneal. Mencionado estudio concluyo que los extractos de manzanilla, así como la apigenina aislado, han demostrado que se unen a receptores de benzodiazepina *in vitro*. Apigenina mostró actividad antiansiedad y sedante con la inyección intraperitoneal en ratones. Además de no poseer efectos anticonvulsivo o miorrelajante

Yamada, et al, en 1996, en Japón; en búsqueda de sustentar las propiedades ansiolíticas después de la administración de un extracto de *Matricaria chamomilla*, en “Effect of inhalation of chamomile oil vapour on plasma ACTH level in ovariectomized-rat under restriction stress”

investigación en la que utilizaron ratas hembras, siendo un criterio de exclusión por parte nuestra. Pospusieron como objetivo, determinar los valores de ACTH en ratas hembras sometidas a stress, en comparación con un grupo control. Concluyendo que las ratas hembras sujetas a ovariectomía propuesta como stress y que recibieron aceite esencial a través de inhalación de *Matricaria chamomilla*, mostraron niveles disminuidos de stress así como también niveles disminuidos de ACTH, en comparación con el grupo control, y sugieren que *Matricaria chamomilla* posee una actividad similar a agonistas de benzodiazepinas.

Gomaa, et al, en 2003, en Egipto, al realizar estudios sobre la propiedades de *Matricaria chamomilla* en “*Matricaria chamomilla* extract inhibits both development of morphine dependence and expression of abstinence syndrome in rats” donde se resalta, el efecto de *Matricaria chamomilla* en el desarrollo de la dependencia de la morfina y la expresión de la abstinencia, se investigó en ratas. Proponiendo como objetivo; evaluar la dependencia de la morfina después de administrar un extracto de *Matricaria chamomilla*, desarrollando un método experimental y de observación que fueron medidos durante los episodios de exposición. Las frecuencias de las señales de comportamiento de abstinencia (temblor de la pata, castañeteo de dientes, temblor muscular, diarrea y micción) y la pérdida de peso inducida por naloxona, fueron evaluadas; dividieron los animales de experimentación en 3 grupos, el grupo de ratas morfina dependiente que recibieron extracto de *Matricaria chamomilla*. Otro grupo al que solo se le administro morfina. Y otro grupo blanco que solo recibió solución salina. Las manifestaciones de comportamiento de abstinencia y la pérdida de peso se inhibieron significativamente por la administración crónica de extracto de *Matricaria chamomilla* con morfina. La administración de una dosis única de *Matricaria chamomilla* ante el reto naloxona en animales dependientes de morfina abolió las manifestaciones conductuales de abstinencia. El dramático aumento de cAMP inducida por plasma de naloxona-precipitado fue impedido por la administración crónica de extracto de *Matricaria chamomilla* con la morfina. Estos resultados concluyen que el extracto de *Matricaria*

chamomilla inhibe el desarrollo de la dependencia de la morfina y la expresión de síndrome de abstinencia.

Roberts y Williams, en 1992, en EEUU, al realizar estudios sobre la sedación con respecto a *Matricaria chamomilla* en “The effect of olfactory stimulation on fluency, vividness of imagery and associated mood: a preliminary study” un estudio realizado en seres humanos, que tiene como objetivo evaluar la conducta de los individuos expuestos a estados de ansiedad luego de recibir exposición al aceite esencial de *Matricaria chamomilla*, proponiendo un método, que es un estudio controlado con placebo de 22 voluntarios que recibieron la inhalación del aceite esencial de *Matricaria chamomilla*. Se pidió a los 22 sujetos a visualizar frases positivas y negativas después de la exposición del aceite de manzanilla y placebo respectivamente. El aceite de manzanilla aumentó significativamente el tiempo de latencia para todas las imágenes, y cambió los estados de ánimo y los juicios de frecuencia en una dirección más positiva. Concluyendo que los estudios realizados sugieren un posible efecto de estos aceites con el origen de los estados de ansiedad.

Avallone, et al, en 2000, en Italia, en búsqueda de evidencias que permitan explicar los efectos sedantes de *Matricaria chamomilla* realizaron una investigación en “Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*.” Hacen mención que se utilizan en gran medida flores secas de *Matricaria chamomilla* L. para proporcionar efectos sedantes así como los efectos espasmolíticos. En el presente estudio, tienen como objetivo examinar, la propiedad farmacológica de una fracción aislada de un extracto metanólico de *Matricaria chamomilla*, que se identificó por análisis de HPLC-MS-MSy su metabolito apigenina, proponiendo un método de estudio de unión de radioreceptores, capacidad de desplazamiento de la flavona por el radioligando. Los estudios electrofisiológicos realizados sobre las células granulares del cerebelo mostraron que la apigenina reducida GABA (ácido gamma-aminobutírico), activado por Cl (-) las corrientes de una manera dependiente de la dosis. El efecto fue bloqueado por la administración de Ro 15-1788, un antagonista específico del receptor de benzodiazepina. En consecuencia, la apigenina reduce la aparición de

convulsiones inducidas por picrotoxina. Por otra parte, la apigenina inyectada por vía intraperitoneal en ratas reduce la actividad locomotora, pero no demostraron efectos ansiolítico, miorelajante o actividades anticonvulsivas. Concluyendo que los presentes resultados parecen sugerir que la actividad inhibidora de la apigenina en el comportamiento locomotor en ratas puede ser atribuida a una interacción con el GABA (A) del receptor de benzodiazepina, sino que también a otros sistemas de neurotransmisión, ya que no está bloqueado por Ro 15-1788.

Navarro, et al, 2011, en Brasil, realizando estudios experimentales en perros tratando de explicar los efectos de *Matricaria chamomilla* sobre la ansiedad en “Efeito da *Matricaria chamomilla* CH12 na resposta de estresse em caes” El objetivo fue evaluar los efectos de la *Matricaria chamomilla* CH12 en la respuesta al estrés en perros bajo el aislamiento social y posteriormente se sometió a ovariectomía (SST). 18, perras saludables distribuidas en dos grupos; tratamientos: PD (n = 9) se administró el placebo y la TC (n = 9) *Matricaria chamomilla* CH12 se administró por vía oral dos veces por 15 días; antes de iniciar el tratamiento, y seguido por 24 horas después de la cirugía. Se evaluó el comportamiento del animal (durante el período de aislamiento), y la concentración de cortisol sérico mediante la recopilación de la sangre venosa de la vena yugular antes de la administración de placebo o *Matricaria chamomilla* (M0), 15 días después de su tratamiento (M1) inmediatamente al final de procedimiento quirúrgico (M2) y las mismas 24 horas (M3). Hubo diferencias significativas en la concentración de cortisol sérico inmediatamente al final de la intervención quirúrgica, con valores más altos en los animales tratados con placebo. Llegando a la conclusión de que el tratamiento con *Matricaria chamomilla* CH12 impide la respuesta inmediata de estrés postquirúrgico, el mantenimiento de la concentración de cortisol sérico estable.

2.3 Bases teóricas

2.3.1 Trastorno de ansiedad

La ansiedad es una sensación normal que experimenta la persona alguna vez en momentos de peligro o preocupación. La ansiedad sirve para poder reaccionar mejor en momentos difíciles. Sin un mínimo de activación un estudiante no estudiaría para sus exámenes; o en una situación peligrosa no reaccionaríamos rápidamente, haciéndolo lo mejor que sabemos. Sin embargo, cuando una persona se encuentra ansiosa con cierta frecuencia sin que parezca haber razón para ello, o cuando esa persona se tensa en exceso, entonces la ansiedad se convierte en un problema que produce sensaciones desagradables. Como la ansiedad es una reacción normal, el objetivo no es hacer que desaparezca, sino aprender a controlarla y reducirla a niveles manejables y adaptativos. (López, 2004).

Cuando una persona tiene ansiedad se produce una excitación en su sistema nervioso, originándose una serie de síntomas. Los más comunes son: tensión en el cuello, hombros y espalda; dificultades de respiración, visión nublada, sofoco; taquicardia, opresión en el pecho; sensación de nudo en el estómago, náuseas; sudoración, temblor, hormigueo en las manos; inestabilidad, entumecimiento en las piernas. Algunas personas, para tratar de reducir la tensión desagradable que sienten cuando están ansiosas, suelen comer, fumar o beber en exceso. De momento, esto les alivia, pero a largo plazo la situación se puede complicar. (Tyrer, 2006).

De hecho, el café, el abuso del alcohol y del tabaco aumentan la tendencia a sentir ansiedad. Otras personas, en cambio, tienden a evitar las situaciones que les producen ansiedad. De momento, esa estrategia funciona. Pero, a largo plazo, las cosas pueden ir a peor. Evitar situaciones puede convertirse en un hábito perjudicial. Cuanto más se evita hacer frente a una situación desagradable, más fuerte se

hace ésta y más débil se encuentra ante ella la persona, que va perdiendo confianza en sí misma. Así, los problemas no sólo no disminuyen, sino que van en aumento. (Bruce, 1989).

El nerviosismo es un estado de excitación, que surge por una causa justificable o no; la ansiedad, por su parte es una emoción indeseada e injustificada, cuya intensidad no guarda ninguna proporción con la posible causa que lo provoca. La ansiedad no es igual al miedo, pues este implica la presencia de un peligro real conocido, se manifiesta con un estado de hiperexcitación nerviosa, se recomienda plantas sedantes que aportan equilibrio al sistema nervioso. (Sevillano, 2003).

La ansiedad es un mecanismo adaptativo natural que permite activar el estado de alerta ante sucesos comprometidos. En realidad, un cierto grado de ansiedad proporciona un componente adecuado de precaución en situaciones especialmente peligrosas. Una ansiedad moderada puede ayudarnos a mantenernos concentrados y afrontar los retos que tenemos por delante. En ocasiones, sin embargo, el sistema de respuesta a la ansiedad se ve desbordado y funciona incorrectamente. Más concretamente, la ansiedad es desproporcionada con la situación e incluso, a veces, se presenta en ausencia de cualquier peligro ostensible. El sujeto se siente paralizado con un sentimiento de indefensión y, en general, se produce un deterioro del funcionamiento psicosocial y fisiológico. Se dice que cuando la ansiedad se presenta en momentos inadecuados o es tan intensa y duradera que interfiere con las actividades normales de la persona, entonces se le considera como un trastorno. (Gross, 2005).

La ansiedad es tal vez la emoción con mayor peso como prueba científica, al relacionarla con el inicio de la enfermedad y el desarrollo de la recuperación. Cuando la ansiedad ayuda a la preparación a enfrentarnos a alguna situación importante, esta es positiva; pero en la vida moderna es frecuente que la ansiedad sea desproporcionada y se relacione con niveles altos de estrés. Pruebas evidentes del impacto

sobre la salud de la ansiedad han surgido de estudios de enfermedades infecciosas, como resfríos, gripes y herpes, donde la resistencia inmunológica de la persona se debilita, permite la entrada del virus y el inicio de la enfermedad. Por otra parte, se conoce el papel que juega la depresión, sobre todo en el empeoramiento de una enfermedad, una vez que esta ha comenzado. Parece tener un riesgo especialmente grave, para los pacientes supervivientes de ataques cardíacos, complica la recuperación de intervenciones quirúrgicas y aumenta el riesgo de muerte en personas con trasplantes. (Battaglia, 2005).

La ansiedad por lo general se acompaña de una sensación de tensión interna y dificultad para relajarse. Es frecuente la hiperactividad del sistema nervioso autónomo; los pacientes suelen quejarse de cefaleas, inestabilidad, visión borrosa, disminución de la salivación, sudoración excesiva, molestias estomacales, taquicardia, mayor frecuencia de las micciones, hormigueos en los miembros, dolores musculares, fatigabilidad precoz, insomnio, irritabilidad, sentimiento de zozobra, impaciencia, preocupación y aprensión. La literatura médica distingue entre los estados de ansiedad puros y otros trastornos emocionales. Las fobias, se diferencian del puro estado de ansiedad en que los síntomas no parecen estar relacionados con un estímulo específico; (Lobo, 1997) dentro de todo este contexto es importante mencionar a los componentes de la ansiedad:

a). Fisiológico: La ansiedad conlleva a un incremento arousal fisiológico del sistema nervioso autónomo, que está asociado a sensaciones, sentimientos o síntomas, experimentados como amenazadores; sin embargo, solo son sensaciones y no son necesariamente peligrosas, puesto que la ansiedad implica reacciones corporales normales.

b). Cognitivo: Se refiere a la influencia de nuestros pensamientos, creencias y expectativas sobre nuestro estado de ánimo y nuestra conducta. Habitualmente no respondemos a las situaciones sino a las interpretaciones o valoraciones que hacemos de las mismas, de este

modo etiquetamos nuestras experiencias pero las interpretaciones no son siempre adecuadas y exactas.

c). Comportamental: Último componente de la ansiedad, hace referencia a la capacidad de la ansiedad para desorganizar la conducta de una persona provocando evitación, escape o disminuyendo el grado de eficacia.

2.3.3 Insomnio y otros trastornos del sueño.

El insomnio es la manifestación de sueño insuficiente o poco reparador. En el caso de los enfermos deprimidos, la forma más típica, es el insomnio de la última parte de la noche, también llamado insomnio terminal o tardío. El paciente se despierta a las 03:00 de la madrugada, por ejemplo, y no puede volverse a dormir. En esas horas de soledad nocturna, el paciente inicia con una serie de pensamientos pesimistas y de impotencia, que le impiden dormir nuevamente un día más; «ni siquiera esto puedo hacer bien»; «no voy a poder continuar con esto»). Despertarse una hora más temprano, del horario habitual, que solía tener el paciente, antes del inicio de su depresión, es considerado como despertar matutino prematuro o insomnio terminal. (Greden, 1974).

En este sentido, una pregunta clave es: ¿a qué hora solía despertarse por última vez en la mañana, para levantarse, antes de estar deprimido? Y, ¿a qué hora en promedio se ha estado despertando sin poder dormir nuevamente, en la última semana? Algunos pacientes con depresión pueden tener datos de insomnio inicial (incapacidad para iniciar el sueño por más de 30 minutos, en el horario acostumbrado) o insomnio terminal (fragmentación del sueño, con despertares de más de 20 minutos o levantarse de la cama, sin tener la necesidad de ir al baño). En un laboratorio de sueño, el enfermo con depresión tiene una serie de alteraciones, de las fases o estadios de sueño, como son: menor cantidad de fases de sueño III y IV (sueño delta), un inicio rápido

al sueño de movimientos oculares rápidos; fragmentación del sueño y despertar matutino prematuro. Sin embargo, puede haber algunos enfermos que, en vez de presentar una baja en calidad y cantidad de sueño, tienen lo opuesto, es decir un exceso de sueño. Estas son personas que duermen de nueve a diez horas, y que refieren que entre más duermen, más deprimidos se sienten, con gran estado de adinamia, debilidad y lentitud psicomotriz. (Brown, 2001).

Agitación psicomotriz y ansiedad psíquica. Estas son dos manifestaciones que se pueden presentar en depresiones, en donde hay un componente sintomático ansioso importante. El médico puede evaluar desde la inspección general al paciente, su estado de agitación psicomotriz, de estar presente, el paciente mueve las manos o los pies de manera inquieta, juguetea con los cabellos, se seca las manos, se levanta y sienta, etc. Además el paciente puede referir que se siente nervioso, y suele mencionar por ejemplo: Ahora me preocupo mucho por la hora que llega mi esposo, si no me habla dos o tres veces al día estoy nerviosa, esto no me sucedía antes. (Riveros, 2007).

La eficacia de las benzodiazepinas en el tratamiento de la ansiedad y la demostración de que su efecto terapéutico esta mediado por el receptor GABA^a sugiere un papel importante del sistema GABAérgico en la génesis de la ansiedad. El GABA es el principal neurotransmisor inhibidor del SNC. Regula la transmisión nerviosa de aproximadamente un tercio de los impulsos cerebrales, entre ellos, sistemas como el adrenérgico o el serotonérgico que, están implicados en la base neurobiológica de los trastornos por ansiedad. De hecho, se ha propuesto que la acción ansiolítica de las benzodiazepinas podría ser consecuencia de la inhibición de la liberación de serotonina en estructuras límbicas. (Goodman, 2003).

El sistema serotonérgico proviene de los núcleos del rafe, tronco del encéfalo; diversas áreas neocorticales y estructuras límbicas que reciben fibras procedentes de los núcleos dorsal, mediano y

mesencefálico del rafe. Dentro del cerebro límbico es particularmente rica la inervación serotoninérgica del complejo septo-hipocámpico, por lo que se considera que puede influir decisivamente sobre los sistemas relacionados con la inhibición de la conducta. En general, la reducción de la transmisión serotoninérgica mediante maniobras farmacológicas muy variadas (bloqueo de receptores, lesiones, toxinas, depleción de 5-HT e inhibición de la síntesis) origina efectos ansiolíticos en el animal de experimentación, por el contrario, el aumento de la actividad del sistema serotoninérgico, mediante agonistas 5-HT o estimulación eléctrica del rafe, origina un efecto ansiogénico (Flores, 1998).

2.3.4 Consideraciones etnobotánicas

El toronjil identificado como ***Melissa officinalis*** Fam. Lamiaceae, es originaria de los países de clima templado. Es una planta herbácea, muy ramificada y frondosa. Sus hojas son pecioladas, ovaladas, opuestas, dentadas, muy rugosas y al frotarlas desprenden un olor a limón. Las flores son blancas y se reúnen en grupos de 3-6 flores. (Kuklinski, 2003). La manzanilla identificada como ***Matricaria chamomilla*** Fam. Asteraceae. Planta que crece sobre todo en Europa central (Hungría, Yugoslavia) y en general en toda Europa. Es una planta anual tiene un disco cónico con abundantes flores amarillas tubulosas y hermafroditas, y en la periferia una sola línea de flores blancas liguladas y femeninas. Hay numerosas semillas y se reproduce en Perú. Las flores no son amargas sino que tienen un aroma agradable. (Kuklinski, 2003).

Melissa officinalis, a pesar de tener un contenido bajo en aceite esencial (0,5ml/Kg.) es este el que tiene interés, no obstante se han aislado de la droga otros constituyentes: triterpenos, ácidos fenólicos derivados del ácido cafeico, dímeros como el ácido rosmarínico y trímeros como los ácidos malitricos A y B; derivado del benzaldehído con estructura benzodioxólica; flavonoides: quercitrósido, ramnocitrina, 7-glucósidos de epigenina y luteolina; heterósidos de monoterpenos y

de alcoholes aromáticos, etc. El aceite esencial se caracteriza por la presencia de aldehídos monoterpénicos: citral (geranial + neral) en cantidad muy variable, pero normalmente en una relación constante (4/3), (R)-(+)-citronelal, acompañados de metilheptenona (producto de degradación del citral), acetato de geranilo, β -cariofileno, óxido de β -cariofileno, germacreno D y varias decenas de compuestos mayoritariamente terpenicos.

Matricaria chamomilla Fam. Asteraceae. Junto con un mucílago galacturónico, cumarinas (umbeliferona, herniarina), ácidos fenólicos y lactonas sesquiterpénicas, la droga contiene en-ino-diciclieteres espirononénicos formados por ciclación de poliínos así como un aceite esencial (3-15 ml/Kg) y flavonoides. Los flavonoides están representados por heterósidos de flavonas, principalmente glucosil-7-apigenina y su derivado acetilado en 6" que se acumulan en las flores liguladas hasta representar el 8% de su masa seca. Se observa también la presencia de glucósidos de luteolol así como la de heterósidos del quercetol y del isorramnetol (flavonoles). En la droga desecada, los heterósidos se encuentran parcialmente hidrolizados y la concentración de apigenina puede ser muy elevada. El aceite esencial debe su color azulado a un contenido generalmente importante (1-15%) de chamazuleno formado por la descomposición de una lactona sesquiterpénica, la matricina. Contiene también diversos sesquiterpenos con esqueleto bisabolano: (-)- α -bisabolol, óxidos A y B de (-)- α -bisabolol y óxido A de (-)- α -bisabolona. Estos sesquiterpenos representan hasta el 50% del aceite esencial, pero sus proporciones varían según el quimiotipo. (Bruneton, 2001).

Huaman, (1996) describe que la planta ***Melissa officinalis*** "Toronjil" es solicitada por la población, sus flores de tonalidad blanquecina-rosada, sus hojas desprenden un olor semejante al limón. Es una de las plantas muy utilizadas en medicina tradicional, a las cuales se les atribuye propiedades anticonvulsivantes, antiespasmódico, cardiotónico, usado también en casos de asma bronquial, cefalea, resfrío, palpitaciones

nerviosas, insomnio, melancolía, histerismo, mareos, calambres, náuseas, hiperémesis gravídica, gastritis, colelitiasis, meteórismo, enteritis, colitis, infecciones víricas y bacterianas, estomáquico, calmante, de uso externo para heridas y llagas, carminativo.

Mestanza, (2000) hace referencia que **Matricaria chamomilla** “Manzanilla” posee usos medicinales como carminativo, antiinflamatorio ocular y bucal, antihemorroidal, sedante y útil en eczemas, insomnio, dolores reumáticos, calmante, emoliente, posible acción espasmolítica en el sistema digestivo, en los trastornos de tipo nervioso de mujeres y niños, en molestias de sus períodos menstruales, estimulante de la digestión, se le atribuye facultades desensibilizantes o antihistamínicas, también, para combatir el asma bronquial de los niños, para problemas de la piel.

Briceño, (1974) realizó un estudio de extracción del aceite esencial de **Melissa officinalis** “Toronjil” refiriéndose a la presencia de grupos químicos que le proporcionan propiedades tranquilizantes. Información etnobotánica, Vega (2001) refiere ciertas propiedades para calmar las cefaleas. Los Tikunas (pobladores indígenas) se lavan la cabeza con agua de estas hojas. Episodios de diarreas son tratadas con una decocción de las hojas, se toma una taza tres veces al día; para estos fines también se usa una mezcla con **Mentha viridis**.

La manzanilla y el toronjil, durante el procesamiento de la droga, específicamente el desecado del vegetal, **Matricaria chamomilla** tiene mayor pérdida debido a la incorporación de hojas, tallos y flores como material vegetal, las flores poseen epidermis más delgada, lo que les permite una mayor permeabilidad que facilita el flujo de aire húmedo. (Instituto de fitoterapia americano, 2000).

2.3.5 Estudio fitoquímico

2.3.5 a) Aceites esenciales

Los aceites esenciales son productos volátiles de naturaleza compleja, elaborados por ciertos vegetales a los que confieren un aroma agradable. Oficialmente, se denominan aceites esenciales a los productos que se pueden obtener por arrastre con corriente de vapor de agua o por expresión del pericarpio de ciertos frutos. Los aceites esenciales están constituidos por una mezcla de sustancias volátiles, compuesta por terpenos, ácidos orgánicos, cetonas, etc.; que son de margen terapéutico estrecho 1g. de aceite esencial representa 100g. de la planta seca, no recomendable en niños ni en pacientes con trastornos neurológicos.

Características: Los aceites esenciales son generalmente líquidos a temperatura ambiente aunque algunos solidifican a baja temperatura como, por ejemplo, la esencia de anís. La mayoría son prácticamente transparentes, incoloros o ligeramente coloreados (amarillentos) con excepciones como la esencia de la manzanilla, que contiene camazuleno de un intenso color azul, algunos aceites esenciales son inflamables. Generalmente, son menos densos que el agua aunque también hay excepciones como las esencias de clavo y de canela, que son más densas. Los aceites esenciales son lipofílicos y solubles en disolventes orgánicos apolares (hexano, éter etílico, etc.). La solubilidad en alcohol es variable y suelen ser solubles en alcoholes de alta graduación. (Instituto de fitoterapia americano, 2002). Su distribución; los aceites esenciales se encuentran casi exclusivamente en vegetales superiores concretamente en ciertas familias de Angiospermae, de las cuales cabe destacar:

Coniferae: Pinnus sp.

Apiáceae o Umbelíferae: anís, hinojo

Labiadae o Lamiaceae: menta, **toronjil**, lavanda

Lauraceae: canela

Asteraceae: **manzanilla**

Mirtáceae: eucalipto, clavo

Retaceae: cítricos

Los compuestos presentes en los aceites esenciales se pueden clasificar en terpenoídes y no terpenoídes.

- **Terpenoídes:** Existen muchas clases de compuestos naturales entre ellos se encuentran los terpenoídes que se distribuyen en diversos vegetales, también se les puede obtener mediante otras vías, como por ejemplo la sintética; los terpenoídes son sustancias volátiles que les otorgan a las plantas y a las flores sus fragancias y olores característicos se presentan ampliamente en las hojas y frutos de las plantas superiores. El termino terpeno fue dado por primera vez a los compuestos hallados de la trementina que es un líquido volátil aislado del pino. (Kuklinski, 2003).

- **Sesquiterpenos**

Características: son estructuras C₁₅ formadas a través de la condensación isoprénica. Se encuentran frecuentemente formando parte de los aceites esenciales pero también hay sesquiterpenos distintos de los que se encuentran en dichos aceites. Entre ellos destacan las láctonas sesquiterpénicas presentes en el árnica o los sesquiterpenos que contiene la valeriana. Láctonas Sesquiterpénicas: dichas estructuras se localizan casi de forma exclusiva en la familia de las Compuestas (Asteraceae). Destacan sobre todo las láctonas sesquiterpénicas del árnica. Están identificados más 120 compuestos químicos, en ***Matricaria chamomilla***, se encuentran metabolitos

secundarios; en donde se identificaron: 28 terpenos, 36 flavonoides y 52 compuestos que poseen el efecto de potenciar la actividad farmacológica del aceite esencial (Mann et al, 1992).

- **Compuestos fenólicos**

Generalmente todos los vegetales, como producto de su metabolismo secundario normal, son capaces de biosintetizar un elevado número de compuestos fenólicos, muchos son indispensables para sus funciones fisiológicas y otros son de utilidad para defenderse ante situaciones de estrés (hídrico, luminoso, etc). Los compuestos fenólicos se originan a partir de dos rutas biosintéticas: la ruta del ácido sikímico que conduce, mediante la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina), y la ruta de los poliacetatos. Igualmente, algunos de los compuestos fenólicos que son principios activos de plantas medicinales se originan a través de rutas mixtas que combinan la vía del sikimato y del acetato, es el caso por ejemplo de los **flavonoides**. (Adzet, 1987)

- **Taninos**

Los taninos son compuestos polifenólicos, complejos, de origen vegetal, masa molecular relativamente elevada, sabor astringente, conocidos y empleados desde hace muchos siglos por su propiedad de ser capaces de convertir la piel en cuero, es decir de curtir las pieles. Esto se debe a su capacidad para unirse a macromoléculas como hidratos de carbono y proteínas. Dentro de los vegetales los taninos suelen encontrarse en las vacuolas celulares, combinados con alcaloides, proteínas u osas. Clásicamente se han distinguido dos tipos de taninos:

a).Taninos hidrolizables, llamados también gálicos o pirogálicos. Estos taninos como su denominación indica se hidrolizan con facilidad tanto por ácidos y álcalis como por vía enzimática y son generalmente de formación patológica. Se localizan en algunas Dicotiledoneae especialmente en **Fagaceae**, **Anacardiaceae** y **Leguminosae**.

b).Taninos condensados o proantocianidinas. Se conocen también como no hidrolizables, ya que se hidrolizan con dificultad y por el contrario, el tratamiento con calor y ácidos minerales origina polímeros de alto peso molecular (flobáfenos). Los taninos presentan también propiedades antioxidantes. Actúan como inhibidores enzimáticos al precipitar la fracción proteica de los enzimas. (Hartisch, 1997).

2.3.6 Mecanismos y sitios de la acción ansiolítica. Diazepam

Los estudios experimentales de los ansiolíticos sobre la *conducta en animales* demuestran de manera constante la capacidad de las benzodiazepinas para liberar una respuesta que previamente había sido suprimida mediante la presentación de un estímulo desagradable. Las benzodiazepinas restablecen la prontitud de esta respuesta, sin afectar la actividad motora o el estado de vigilia o atención del animal. Los estudios *electrofarmacológicos* demuestran que la región más sensible a la acción de las benzodiazepinas es el sistema límbico y, dentro de él, el hipocampo y la amígdala. Esta acción se diferencia de la ejercida por barbitúricos y otros hipnóticos, los cuales ejercen su acción más generalizada en la formación reticular. Dado el papel que el hipocampo, el septo y la amígdala desempeñan en la ansiedad, se puede relacionar la actividad ansiolítica con la acción depresora ejercida selectivamente a este nivel, tal acción farmacológica se debe a su capacidad de incrementar la actividad inhibitoria del GABA, ya sea directamente sobre el cerebro límbico o bien indirectamente inhibiendo la actividad serotoninérgica de los núcleos del rafe que proyectan hacia la amígdala y el hipocampo. (Flores 1988).

2.3.6 a) Acción miorrelajante de las benzodiazepinas

El diazepam y otras benzodiazepinas producen relajación de la musculatura esquelética en estados distónicos, discinéticos, hipertónicos y espásticos. La acción miorrelajante se ejerce sobre el SNC (no en la placa motriz ni en el músculo) a varios niveles: a) en la

propia médula espinal, donde facilita fenómenos de inhibición presináptica; *b*) en la formación reticular activadora descendente del tronco del encéfalo; *c*) en los ganglios basales, y *d*) en el cerebelo. En la práctica, la acción miorrelajante se observa con dosis que también producen sedación, lo que limita su utilidad. (Chopin et al, 1987).

2.3.7 El receptor NMDA (activado selectivamente por el N-metil-D-aspartato)

Es un receptor que funciona como un canal que, además de permitir el flujo de Na^+ y K^+ , también es permeable para el Ca^{+2} , por lo que su activación desencadenará además respuestas derivadas del incremento de calcio intracelular. Este receptor muestra varias singularidades. Es altamente sensible al Mg^{+2} en situación de reposo, los receptores de NMDA son escasamente afectados por los agonistas si existen concentraciones submilimolares de Mg^{+2} pero cuando la membrana es despolarizada, el bloqueo por Mg^{+2} deja de ser activo y el canal se abre en respuesta al agonista. Esto significa que el Mg^{+2} muestra afinidad por un sitio que se encuentra situado en la profundidad del canal; esta afinidad disminuye conforme la membrana se despolariza, lo cual significa que para que un receptor NMDA pueda ser activado por un agonista, la célula ha de ser previamente despolarizada (p. ej., por activación previa de un receptor no-NMDA).

Además, el receptor NMDA contiene varios sitios de regulación. Uno de ellos ha de ser ocupado obligadamente por la glicina para que el receptor pueda ser activado por un agonista, comportándose así como un coagonista; la D-serina muestra similar actividad. El segundo sitio de regulación fija determinados compuestos (fenciclidina o PCP, ketamina, dizocilpina o MK801) que antagonizan selectiva, pero no competitivamente, la activación producida por NMDA. Su utilización es uso-dependiente, lo que significa que estos compuestos sólo son activos si el receptor ha comenzado a estar estimulado. Los otros sitios de regulación son para el Zn^{+2} que bloquea el canal con independencia

de su estado de actividad y para poliaminas (espermina y espermidina) que facilitan la activación del canal. (McBain et al, 1994).

El receptor NMDA es una proteína muy compleja y tremendamente regulada. Su conductancia al Ca^{2+} es notablemente alta y es ésta quizá su característica más destacable y la responsable de muchas de sus funciones. Otra característica especial del receptor NMDA es que para que el canal se abra se necesita, además del glutamato, la presencia de un co-agonista (el aminoácido glicina). Ciertas poliaminas, al igual que la glicina, modulan positivamente el canal, mientras que el cinc y un exceso de protones lo modulan negativamente. Sin embargo, lo más llamativo de este receptor es que comparte características funcionales de canales regulados por ligando y de canales sensibles al voltaje y dependientes de uso. Esta propiedad está relacionada con el bloqueo efectivo del canal del receptor NMDA por el ion Mg^{2+} , cuando el potencial de membrana está próximo al valor de reposo.

Una gran parte de las acciones mediadas por los receptores NMDA se basa en la regulación del flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula. La activación de los receptores NMDA permitiría un rápido influjo de Ca^{2+} , con la consiguiente elevación intracelular de Ca^{2+} , lo cual dispararía una cascada de sistemas de segundos mensajeros que podría producir acciones muy diversas.

Glutamato y receptores NMDA están involucrados en numerosas funciones dentro del sistema nervioso. Uno de los procesos más estudiados en el que los receptores NMDA parecen jugar un papel clave es la plasticidad sináptica. La maduración de los circuitos nerviosos (establecimiento de conexiones funcionales) durante el desarrollo, y también en el adulto, depende de la activación y consolidación de ciertas sinapsis, mediante mecanismos de plasticidad en el que están involucrados los receptores NMDA.

Si bien éstas y otras funciones normales dependen de la precisa activación de los receptores NMDA en el momento y lugar adecuados, es cierto también que un desequilibrio producido por la sobre activación del receptor (por liberación excesiva de glutamato, por ejemplo) podría conducir a ciertas enfermedades como la epilepsia o a la muerte neuronal por sobreexcitación en situaciones de hipoxia. (Ohno, 2008).

2.3.8 Estudio de toxicidad de las plantas

Uno de los primeros estudios farmacológicos a realizar a una sustancia, producto o principio activo a la que se le atribuye un efecto terapéutico, es la toxicidad. Toda sustancia o mezcla de sustancias a ser utilizadas en medicina no solo deben de poseer efectos terapéuticos sino además deben de ser inocuas. Todo producto sintetizado o de origen natural que contengan principios activos, pueden producir efectos no deseados a corto o largo plazo. Por ello en la elaboración de medicamentos resulta esencial seleccionar sustancias que ofrezcan un margen de seguridad adecuado. La toxicidad e inocuidad de un producto, no solo depende de la sustancia en sí, sino también del tipo del envase con el que está en contacto y las condiciones y procedimientos empleados para su elaboración y/o dispensación. (Lock Sing, 1999).

Las enfermedades mentales son causa de gran sufrimiento personal para quienes la padecen y para las personas en su entorno. En un país donde la atención psiquiátrica no está disponible en varias regiones y donde los seguros privados no están obligados por ley a cubrir tales atenciones, la enfermedad mental empobrece rápidamente a la familia. Por otro lado, la falta de un sistema de atención y rehabilitación con base en la comunidad, obliga a que los pacientes con síntomas graves, que dificultan significativamente la interacción familiar, deban vivir y permanecer todo el día en sus casas, el resultado es el rechazo familiar, la discriminación y exclusión del enfermo y del familiar que lo cuida, con graves consecuencias para el cuidador. (Prados-Atienza, 2005).

Las pérdidas en términos de años de vida sana son también importantes, se sabe que para el año 2002 los DALY (disability adjusted life year) perdidos por enfermedades neuropsiquiátricas en el Perú (estimados por OMS) eran del orden de 1078, de los cuales 336 correspondían a las pérdidas por depresión unipolar. La complejidad multifacética del sistema nervioso central es tal que se puede aceptar que es el sustrato de toda la vida mental y de la conducta humana. Partiendo del reconocimiento que todas las experiencias psicológicas son finalmente codificadas en el cerebro, y que todos los fenómenos psicológicos representan procesos biológicos, la moderna neurociencia de la mente ofrece un entendimiento enriquecido de la inseparabilidad de la experiencia humana, el cerebro y la mente. (Aliaga, 2009).

Por lo tanto, las repercusiones de la exposición a la pobreza, la violencia, la frustración se traduce en alteraciones del sistema nervioso central. Las manifestaciones de estas modificaciones, que son las enfermedades mentales deben ser atendidas prioritariamente, con una perspectiva de salud pública, equidad y derechos humanos, pues su alta prevalencia y su impacto individual y colectivo hacen de los trastornos mentales un verdadero problema de salud pública en el Perú.

2.4 Definición de términos

Ansiedad: Es un mecanismo defensivo. Es una respuesta de alerta ante situaciones consideradas amenazantes. Es un mecanismo universal, se da en todas las personas, es normal, adaptativo, mejora el rendimiento y la capacidad de anticipación y respuesta. La función de la ansiedad es movilizar al organismo y mantenerlo alerta y dispuesto para intervenir frente a los riesgos y amenazas, de forma que no se produzcan o perjudiquen. La ansiedad pues, nos empuja a tomar las medidas convenientes (huir, atacar, neutralizar, afrontar, adaptarse, etc.).

DAP-7: (ácido D-2- amino-7-fosfonoheptanoico). Es uno de los antagonistas competitivos más potentes de los receptores de NMDA, pertenece a la serie D (no natural) de los aminoácidos y presentan un grupo ácido fosfónico separado de la unidad básica, glicinato, por una cadena de más de tres eslabones. Además, las formas insaturadas o con conformaciones restringidas por la presencia de sustituyentes o anillos lipofílicos presentan mayor potencia, selectividad y accesibilidad al sistema nervioso central. Los antagonistas del receptor NMDA poseen interesantes propiedades farmacológicas (carácter anticonvulsionante, relajante muscular, gran eficacia en la prevención de la degeneración neuronal por excitotoxicidad, etc.) por lo que ya existen varios fármacos patentados y en las últimas etapas de desarrollo clínico.

Diazepam: Es un fármaco derivado de la 1,4-benzodiazepina, con propiedades ansiolíticas, miorelajante, anticonvulsivantes y sedantes. El diazepam se utiliza para tratar estados de ansiedad y está considerada como la benzodiazepina más efectiva para el tratamiento de espasmos musculares.

Hipnótico: Una droga hipnótica produce somnolencia y facilita el inicio y el mantenimiento de un estado de sueño parecido al normal. A este efecto se le ha llamado hipnosis, sin que esto tenga relación con ese estado inducido artificialmente por sugestibilidad.

Metabolito secundario: Son sustancias de origen natural que no son vitales para el organismo que las produce, son menos abundantes que los metabolitos primarios, frecuentemente se observan en células u órganos especializados y están implicados en la regulación de las plantas con otros organismos de su entorno.

Plantas medicinales: Se denomina así a aquellas plantas cuyas partes o extractos se utilizan como drogas o medicamentos para el tratamiento de alguna afección o enfermedad que padece un individuo o animal. La

mencionada parte de este tipo de plantas es conocida popularmente como droga vegetal y puede ser suministrada a través de diferentes vías: cápsulas, comprimidos, cremas, elixir, decocción, infusión, jarabe, pomada, tintura, y ungüento, entre otras.

Receptor de NMDA: Los receptores NMDA o NMDAr (de N-metil-D-aspartato) son receptores ionotrópicos de glutamato, un neurotransmisor, que actúan como componentes prioritarios en la plasticidad neuronal y memoria. El acrónimo NMDA procede de N-metil D-aspartato, un agonista selectivo que une a este tipo de receptores de glutamato pero no a otros tipos. Su activación conduce a la apertura de un canal iónico no selectivo para toda clase de cationes.

Sedante: Una droga sedante disminuye la actividad, modera la excitación y calma al que la recibe. La sedación puede ser también un efecto adverso de muchos fármacos que no son sedantes propiamente, ni son capaces de producir anestesia. Las BDZ, a pesar de que tampoco producen anestesia, se consideran como sedantes e hipnóticos.

Toxicidad crónica: Efectos adversos que ocurren como resultado de dosis repetidas con una sustancia química sobre una base diaria, o exposición a la sustancia química durante la mayor parte de vida de un organismo (generalmente, más del 50%). Con animales experimentales, esto generalmente significa un período de exposición de más de tres meses. Los estudios con exposición crónica durante dos años, se hacen con ratas o ratones para evaluar el potencial carcinogénico de las sustancias químicas.

CAPITULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Tipo y Diseño de Investigación

El presente trabajo es un estudio de investigación experimental debido a que se manipularan deliberadamente una o más variables independientes para analizar las consecuencias que la manipulación tiene sobre estas variables dependientes. (Hernández, 1998).

Por las características del diseño es un estudio:

- Experimental
- Prospectivo
- Transversal

3.2 Unidad de análisis

Animales de experimentación, entre ellos ratas y ratones que fueron sometidos a los métodos de inducción de la ansiedad y a la observación de los datos conductuales en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNMSM,

3.3 Población de estudio

Población: Animales de experimentación ratas y ratones obtenidos del Instituto Nacional de Salud INS. Chorrillos – Lima.

3.4 Tamaño de muestra

Muestra:

Animales de experimentación; 36 ratones divididos en 6 grupos, en el test de inducción del sueño y 36 ratones divididos también en 6 grupos, en el test de hiperactividad y/o cambios conductuales; 10 ratas machos y 10 hembras, para el ensayo de toxicidad.

3.5 Selección de muestra

Se obtuvo los animales de experimentación del Instituto Nacional de Salud INS. La selección de los animales se realizó en base al cumplimiento de los siguientes criterios:

Criterios de Inclusión:

1. Material Botánico

- Para el presente trabajo se utilizaron muestras frescas con hojas y flores de la planta entera sin raíz de *Melissa officinalis* “Toronjil” y *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” del Distrito de Huasahuasi (2754 m.s.n.m.), Provincia de Tarma, Departamento de Junín, colectadas en el mes Septiembre.

2. Animales de experimentación

- Se utilizaron ratones albinos machos de 27.5 ± 2.5 g. de peso corporal.
- Ratas albinas de cepa Holtzman machos y hembras de 175 ± 25 g. de peso corporal. Ambos obtenidos del Bioterio del Instituto Nacional de Salud ubicado en el Distrito de Chorrillos de la Ciudad de Lima, mantenidos en un ambiente a temperatura de 21 °C con dieta y agua a libertad.

Criterios de exclusión:

- Muestras vegetales recolectadas de otro lugar de origen distinto al propuesto en el presente estudio.
- Ratones albinos hembras y de peso mayores a 30 g.
- Ratas albinas de cepa diferente a Holtzman de peso mayores a 200 g.

3.6 Técnicas de recolección de datos.

La principal técnica fue la de observación y el registro directo de los datos a través de la ficha de investigación (Anexo 6).

Se realizaron los siguientes procesos:

1. Realización del estudio fitoquímico preliminar del extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chomomilla* “Manzanilla”.

Se realizó el análisis fitoquímico preliminar en forma cualitativa, para detectar los diferentes metabolitos secundarios presentes en las plantas, estas pruebas fueron basadas en la aplicación de reacciones fisicoquímicas de coloración y/o precipitación según Lock de Ugaz, 1988.

Determinación de los principales grupos de metabolitos primarios / secundarios.

A una solución acuosa de la muestra (5 mg/mL), se realizó las siguientes pruebas:

a) Determinación de aminoácidos libres (metabolito primario)

A 5 mg. del extracto etanólico de *Melissa officinalis* "Toronjil" más *Matricaria chamomilla* "Manzanilla" se le agregó 3 gts del reactivo Ninhidrina, se agitó, el color violáceo indica presencia de aminoácidos libres.

b) Determinación de taninos

Con gelatina – cloruro de sodio: A 1 mL de muestra se agregó 3 gotas de reactivo, en un principio se forma en la solución una sustancia en forma de nube, luego de centrifugar queda en el fondo un precipitado de color blanco. Este confirma la presencia de taninos.

Con cloruro férrico o alumbre férrico: A la muestra se agregó unas gotas de cloruro férrico o alumbre férrico; una coloración negra azulada nos indica que el tanino pertenece a los derivados del ácido pirogálico, mientras que la coloración verde nos indica que deriva de la catequina.

c) Determinación de alcaloides

Reactivo de Dragendorff: Se disolvió 8g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 20 mL de HNO_3 y mezcló con 50 mL de una solución acuosa conteniendo 27,2 g de KI, se dejó reposar la solución, decantó el sobrenadante y diluyó a un volumen de 100 mL. Al agregar unas

cuantas gotas de este reactivo a una solución ácida de la muestra se observó la aparición de un precipitado que va del naranja al rojo.

Reactivo de Mayer: Se disolvió 1,36 g de HgCl_2 en 60 mL de agua y se adicionó 10 mL de una solución conteniendo 5 g de KI y se diluyó hasta un volumen de 100mL. Al agregar un exceso de reactivo a una solución acidulada de la muestra se observa la aparición de un precipitado de blanco a crema.

d) Determinación de azúcares (metabolito primario).

A 5 mg del extracto etanólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” se le adicionó 3 gotas del reactivo de Molish, más 1 mL de H_2SO_4 concentrado, se le mezcló y la presencia de un anillo violáceo indicó la presencia de azúcares formando parte de glicósidos.

e) Determinación de quinonas

Se pesaron dos gramos de muestra y se trituro hasta un polvo muy fino en un mortero, luego se realizarán los siguientes ensayos químicos:

Solubilidad en NaOH al 5%

En un tubo de ensayo se introdujeron 10 mg de la muestra, se añadió 0,2 mL de etanol y 0,4 mL de NaOH al 5%. El cambio de coloración nos indicó la presencia de compuestos quinónicos.

Reacción de Bornträger

Un gramo de muestra se trató con NaOH 5% en caliente, se filtró, enfrió y se aciduló con HCl 20%, se añadió benceno, agitó y se dejó en reposo. Luego se separó la fase bencénica a la cual se le añadió NH_4OH .

La formación de una coloración rosada a roja, indicó la presencia de antraquinonas. Fue necesario dejar un buen tiempo, para que la reacción ocurra.

f). Determinación de saponinas

Prueba de la espuma

A una solución acuosa de la muestra conteniendo 5 mg/mL, se sometió a una agitación vigorosa durante 30 segundos. La presencia de la saponina se manifestó por la formación de una espuma persistente durante 3 min.

Reactivo de Liebermann – Buchard

A una pequeña cantidad de la muestra se añadió unas pocas gotas de ácido acético más 3 mL de anhídrido acético/H₂SO₄ (50:1), con lo cual las saponinas triterpenoidales dan color rosado a púrpura, mientras las esteroidales dan azul – verdoso.

g). Determinación de flavonoides

Con reactivo Shinoda: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de muestra con 1 limadura de magnesio pequeña, con un gotero se añadió 3 gotas de HCl concentrado. Se observó un intenso burbujeo por la reacción de las limaduras y la solución adquiere una débil coloración naranja al principio; conforme va reaccionando más, la coloración naranja se va intensificando, hasta que después de 10 minutos la solución tiene un color tono rojo. Lo que indica un resultado positivo.

2. Evaluación del efecto sedante del extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre la ansiedad inducida en ratones albinos, estableciendo la dosis efectiva 50 ansiolítica.

Método de inducción de hiperactividad y/o cambios conductuales.

Para inducir los cambios conductuales en los ratones se utiliza el test de N-metil-D-aspartato (NMDA), descrito por (Ngo Bum et al, 2002), (Shmutz, et al. 1990), en el diseño experimental se consideró de 2 grupos control: uno con solvente twen 5 mL/Kg. y otro controlado recibiendo 0.33 η mol/Kg. DAP7 (ácido D-2- animo-7- fosfonoheptanoico) un competitivo antagonico (Croucher et al, 1982).

Procedimiento de inducción de hiperactividad y/o cambios conductuales.

Se realizó mediante la observación por 30 minutos. Los animales que no exhibieron un cambio de conducta dentro del periodo de observación de los 30 minutos fueron declarados protegidos.

Los animales fueron mantenidos en jaulas de crianza acondicionados al ambiente de laboratorio con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas a una temperatura ambiente, de igual manera recibirán su alimento y agua *ad libitum*. El día del ensayo se empezó privando de agua y alimentos 12 horas antes del ensayo para la determinación de la hiperactividad y los cambios conductuales. Se utilizaron 36 ratones divididos al azar en 06 grupos de 6 animales a quienes se les observó su comportamiento conductual antes de la inducción con N-metil-D-aspartato (NMDA). Los animales marcados, pesados y distribuidos al azar se identificaran en los siguientes grupos:

Grupo 1: Normal (Solucion de twen 80, 5 mL/Kg.)
Grupo 2: N-metil-D-aspartato (NMDA) en una dosis de 75 mg/Kg.
Grupo 3: EAMM a dosis de 1 g/kg, + (NMDA) dosis de 75 mg/Kg.
Grupo 4: EAMM a dosis de 2 g/kg,+ (NMDA) dosis de 75 mg/Kg.
Grupo 5: EAMM a dosis de 4 g/kg,+ (NMDA) dosis de 75 mg/Kg.
Grupo 6: DAP7 a dosis de 0.33 η mol/Kg,0 + (NMDA) dosis de 75 mg/Kg.

Para el cálculo de la dosis efectiva media (DEM 50) se utilizó el Método de Litchfield-Wilcoxon un método estadístico para la determinación de DEM 50. (Ruiz et al, 2004).

INDICADOR DE MEDIDA: La DEM 50 fue expresada en mg/Kg.

- 3. Determinación del efecto sedante comparativo de la administración del extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” presenta efecto sedante en comparación con estándares farmacológicos en la ansiedad inducida en ratones albinos.**

Método de inducción del sueño.

Se utilizó el test de Inducción del sueño en ratones por diazepam, método descrito por Beretz et al, 1978 y modificado por Rakotonirina et al, 2001 donde se estudia los efectos potenciales de la planta sobre el sueño. (Ngo bum et al, 2004).

Procedimiento de inducción del sueño.

Los animales de experimentación adaptados a las condiciones de laboratorio. Los animales fueron marcados y pesados periódicamente hasta la culminación del ensayo experimental. Los animales de experimentación fueron distribuidos en los siguientes grupos:

Grupo 1: Solución de twen 80, 5 mL/Kg.

Grupo 2: EAMM a dosis de 1 g/kg + diazepam (50 mg/Kg.).

Grupo 3: EAMM a dosis de 2 g/kg + diazepam (50 mg/Kg.).

Grupo 4: EAMM a dosis de 4 g/kg + diazepam (50 mg/Kg.).

Grupo 5: Diazepam (50 mg/Kg.)

El tiempo de observación entre la desaparición y la recuperación del reflejo directo; se mide el tiempo de dormir.

- 4. Determinación de la seguridad del extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” a nivel bioquímico y anatomopatológico al ser administrado por vía oral en ratas normales durante 60 días.**

Método de evaluación de toxicidad crónica.

Se utilizó el modelo de toxicidad crónica en ratas. (OECD, 1996)

Procedimiento de observación por dosis repetida, inducción de toxicidad crónica.

Se agrupó a los animales 10 machos y 10 hembras, ratas Holtzman de un promedio de 175 ± 25 g. y de 2 meses de edad, a los cuales se le dividió en 2 grupos por género. A 5 machos se les administró diariamente el solvente (Solución de twen 80, 5 mL/Kg.) mientras que a los 5 restantes se les administró el extracto diariamente, de la misma manera se realizó con las hembras; se fueron observando los

efectos diarios que se presentaron (aumento de secreciones, palpitaciones, etc).

La dosis a administrar fue de 4 g/Kg del extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” en forma repetida por vía peroral diariamente hasta la culminación del ensayo experimental (60 días) y al grupo control solución de twen 80, 5 mL/Kg. (emulsificante). Luego los animales fueron sacrificados administrándoles pentobarbital a dosis de 100 mg/kg. Se procedió a la obtención de sangre por punción cardiaca para la realización de los análisis bioquímicos: colesterol, urea, creatinina, transaminasas, lipoproteína HDL. Todos los órganos fueron conservados en formol al 10% para posterior examen anatomopatológico y determinar los posibles cambios histológicos, en relación al grupo control.

Rango de toxicidad crónica

DOSIS	CLASIFICACIÓN
< 25 mg/kg	Muy tóxica
< 200 mg/kg	Tóxica
< 2 000 mg/kg	Dañina
> 2 000 mg/kg	No clasificada

(OECD, 1996)

Se observó el comportamiento de los animales durante 60 días.

Prueba de hipótesis

Hipótesis nula (H₀): El extracto alcohólico de hojas y flores de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” no ejerce efecto sedante sobre la ansiedad inducida en ratones albinos.

Hipótesis alternativa (H₁): El extracto alcohólico de hojas y flores de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” ejerce efecto sedante sobre la ansiedad inducida en ratones albinos. Por los datos obtenidos en el presente estudio rechazamos la Hipótesis Nula (H₀) y aceptamos la Hipótesis Alternativa (H₁); concluimos que “hay suficiente evidencia estadística para inferir que la Hipótesis Nula (H₀) es falsa” con (p<0.05).

4.1 Análisis, interpretación y discusión de los resultados

Procesamiento estadístico

Los datos fueron expresados utilizando la estadística descriptiva haciendo uso de valores medios \pm error estándar, porcentajes, intervalos de confianza al 95%, valores mínimos y máximos. Así como también se aplicó análisis estadístico inferencial de las variables cuantitativas empleándose el análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA) que permitió determinar si existe diferencia estadísticamente significativa para la variable evaluada intergrupos e intragrupos, luego se realizó un análisis de múltiples comparaciones tipo post hoc mediante el test de LSD. Se consideró un nivel de significancia fijado en $p < 0.05$. Se usó el software estadístico SPSS for Windows 13.0 año 2005.

Consideraciones éticas

En el estudio experimental al utilizar animales de experimentación específicamente ratones y ratas se tuvieron en cuenta las normas y los procedimientos éticos para el manejo de animales de laboratorio establecidos internacionalmente. (Guide for the care and use of laboratory animals, 1996).

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

4.1 Presentación de resultados

4.1. Obtención del extracto etanólico de las hojas y flores de *Melissa officinalis* "Toronjil" más *Matricaria chamomilla* "Manzanilla"

4.1 a Recolección de la muestra vegetal

Las plantas en estudio fueron recolectadas en el Distrito de Huasahuasi (2754 m.s.n.m.), Provincia de Tarma, Departamento de Junín. Se recolecto la planta entera en su estado silvestre (hojas, tallos y flores), sin raíz con tijera podadora, en un día soleado, y fueron colocados en una bolsa de papel, previamente con la colocación de alcohol al 96 %. (Sharapin, 2000).

4.1 b. Identificación de la especie

Taxonómicamente las plantas fueron identificadas como: ***Melissa officinalis* "Toronjil" y *Matricaria chamomilla* "Manzanilla"** (Ver Anexo N° 1 y 2).

4.1 c. Preparación del extracto alcohólico

Secado y molienda de la planta

Se sometió la muestra a un ligero secado natural en un área sombreada, ventilada y a temperatura ambiente en tendales de papel kraf que se fue cambiando constantemente. Se seleccionó la muestra y se realizó la preparación del extracto primero por separado cada planta midiendo el peso de la muestra a utilizar.

Preparación del extracto

Se obtuvieron los extractos alcohólicos de “Manzanilla” y “Toronjil” en una proporción del 50% (P/V) para lo cual se procedió a la extracción alcohólica. (Sharapin, 2000). Ambos extractos fueron conservados a una temperatura de 4 a 8 °C.

Una vez obtenido ambos extractos estos fueron mezclados en proporciones iguales y resuspendidos en twen 80, tuvo el aspecto de masa homogénea, de consistencia blanda, color verde petróleo, libre de partículas extrañas.

Los rendimientos se obtuvieron por diferencia de peso húmedo y seco de planta entera (hojas y flores), cuyos resultados fueron de 3.4 % por 100 g de ***Matricaria chamomilla*** “Manzanilla” y de 2.2 % por 100 g de ***Melissa officinalis*** “Toronjil”.

4.2 Marcha fitoquímica

Tabla 1. Marcha fitoquímica del extracto alcohólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla”

Reactivo:	Metabolito primario/secundario	Resultado
Ninhidrina	Aminoácidos libres	-
Gelatina	Taninos	-
Tricloruro férrico	Compuestos fenólicos	++
Dragendorff	Alcaloides	-
Molisch	Azúcares	+
NaOH 10%	Quinonas	-
Mayer	Alcaloides	-
Liebermann	Esteroides y triterpenos	++
Shinoda	Flavonoides	+

Leyenda: (+++) = abundante cantidad; (++) = regular cantidad;
(+) = poca cantidad; (-) = ausencia

Tabla 2. Marcha fitoquímica del extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil”

Reactivo:	Metabolito primario/secundario	Resultado
Ninhidrina	Aminoácidos libres	-
Gelatina	Taninos	+
Tricloruro férrico	Compuestos fenólicos	++
Dragendorff	Alcaloides	-
Molisch	Azúcares	++
NaOH 10%	Quinonas	+
Mayer	Alcaloides	-
Liebermann	Esteroides y triterpenos	++
Shinoda	Flavonoides	+

Leyenda: (+++) = abundante cantidad; (++) = regular cantidad;
(+) = poca cantidad; (-) = ausencia

Tabla 3. Marcha fitoquímica del extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla”

Reactivo:	Metabolito primario/secundario	Resultado
Ninhidrina	Aminoácidos libres	-
Gelatina	Taninos	++
Tricloruro férrico	Compuestos fenólicos	+++
Dragendorff	Alcaloides	-
Molisch	Azúcares	++
NaOH 10%	Quinonas	+
Mayer	Alcaloides	-
Liebermann	Esteroides y triterpenos	+++
Shinoda	Flavonoides	+

Leyenda: (+++) = abundante cantidad; (++) = regular cantidad; (+) = poca cantidad; (-) = ausencia

4.3 Efecto del extracto alcohólico de las hojas y flores de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre la hiperactividad y los cambios conductuales sobre la ansiedad.

Tabla 4 y figura 1, muestran el efecto del extracto alcohólico de hojas y flores de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” (EAMM) sobre la hiperactividad estimulados por NMDA, donde se midió el tiempo de duración de hiperactividad expresado en número de animales declarados protegidos, observándose un mejor efecto a dosis de 4 g/Kg.

Tabla 4: Animales con hiperactividad por NMDA, y porcentaje de protección por el antagonico DAP7 y el extracto de EAMM.

Dónde: hiperactividad, es movimientos involuntarios medidos hasta 30 minutos.

Tratamiento	n	N° animales con	
		hiperactividad	Protección %
Sol. Twen 80	6	0	0
NMDA	6	6	0,00
NMDA + DAP7	6	0	100,00
EAMM 1 g/kg	6	2	67,00
EAMM 2 g/kg	6	1	83,00
EAMM 4 g/kg	6	0	100,00

$$\% \text{ de Protección} = [((\text{control} - \text{tratamiento})/\text{control})] \times 100$$

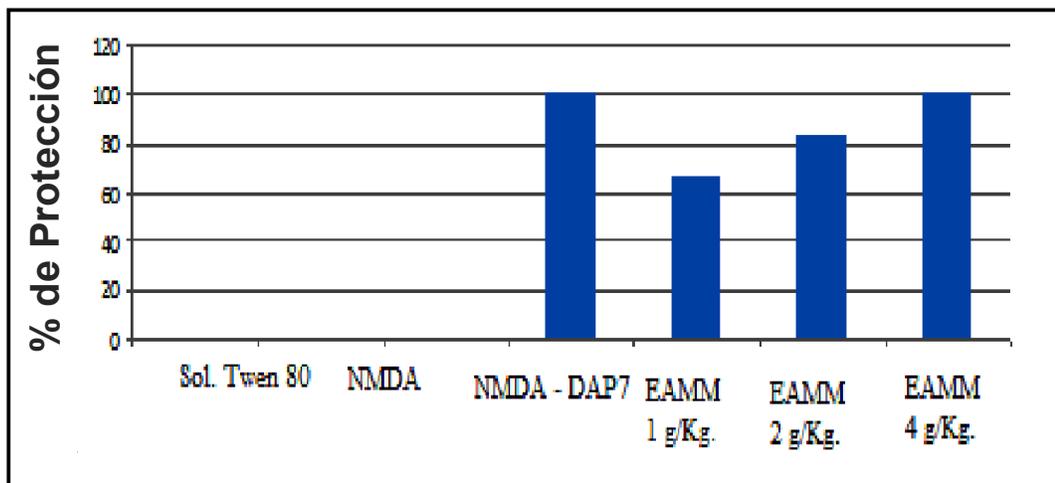


Figura 1. Porcentaje de animales protegidos frente a la inducción de hiperactividad de cambios conductuales con NMDA (N-metil-D-aspartato). Está dado por los datos obtenidos por el grupo control menos tratamiento sobre control por 100.

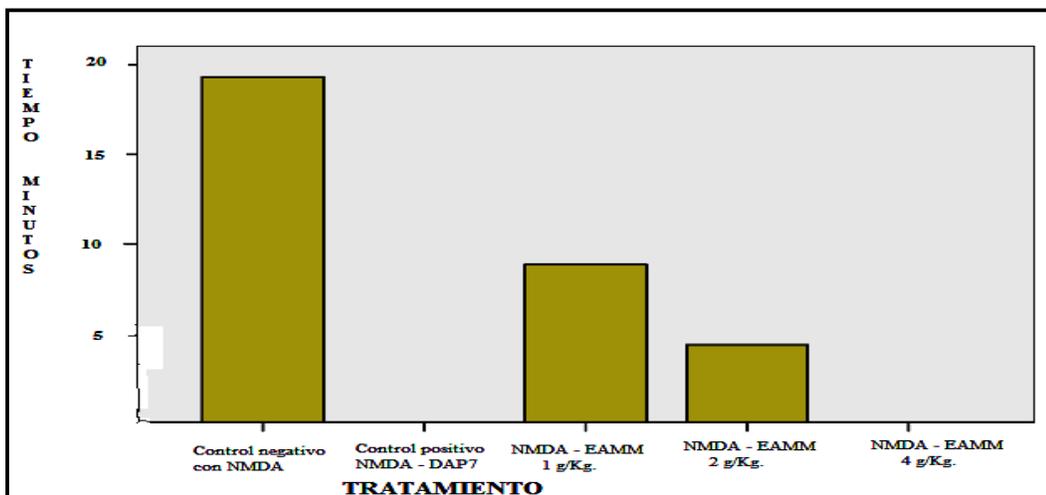


Figura 2. Duración de tiempo expresado en minutos de los episodios de hiperactividad y cambios conductuales, producidos por la administración de NMDA y antagonizadas por DAP7 y EAMM.

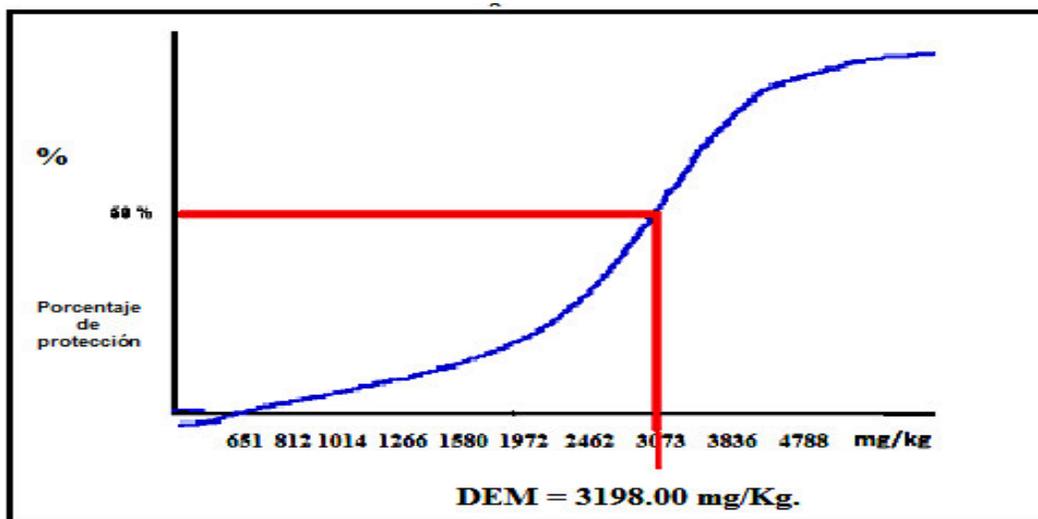


Figura 3. Dosis efectiva media del extracto alcohólico de hojas y flores de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre la hiperactividad y los cambios conductuales inducidos con NMDA.

4.4 Efecto sedante del extracto alcohólico de las hojas y flores de *Melissa officinalis* "Toronjil" más *Matricaria chamomilla* "Manzanilla" en comparación con el estándar Farmacológico diazepam.

La **figura 4**, muestra el efecto sedante del extracto alcohólico de hojas y flores de *Melissa officinalis* "Toronjil" más *Matricaria chamomilla* "Manzanilla" (EAMM) en comparación con el estándar farmacológico diazepam, observándose un mejor efecto a dosis de 4 g/Kg.

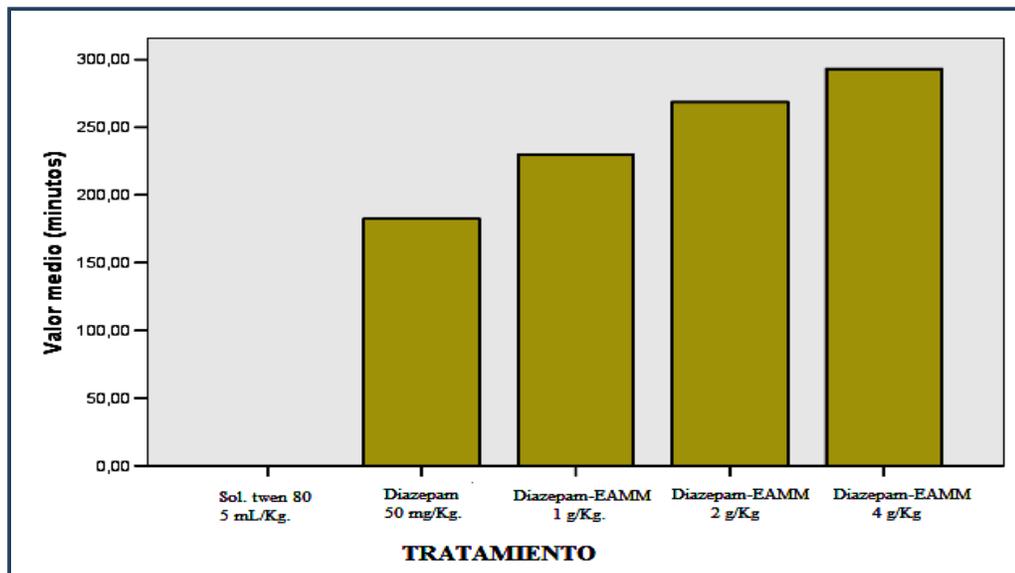


Figura 4. Tiempo de dormir en minutos, comparado con el estándar farmacológico diazepam 50 mg/Kg.

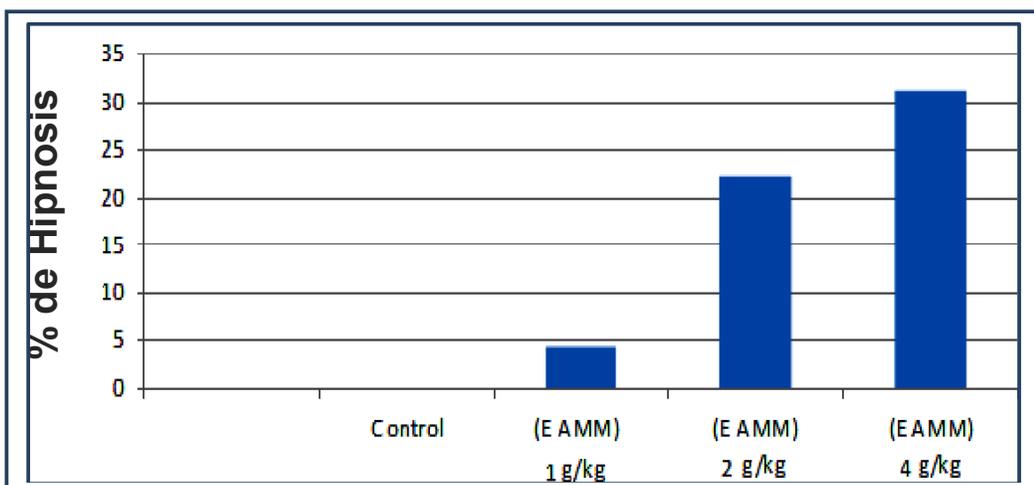


Figura 5. Porcentaje de hipnosis (tiempo de dormir), comparado con el estándar farmacológico diazepam.

5. Seguridad del extracto alcohólico de las hojas y flores de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla”

Tabla 5. Observaciones histopatológicas agrupadas en comparación entre Solución Twen 5 ml/Kg. (Solvente del extracto) y extracto alcohólico 4 g/Kg. de hojas y flores de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla*” Manzanilla” (EAMM) durante 60 días.

Graf. N°	Tratamiento durante 60 días	Observaciones
1	Solución Twen 80, 5 ml/Kg	Cerebro: Sin alteraciones
2	EAMM 4 g/Kg.	Cerebro: Sin alteraciones
3	Solución Twen 80, 5 ml/Kg	Bazo: Sin alteraciones
4	EAMM 4 g/Kg.	Bazo: Sin alteraciones
5	Solución Twen 80, 5 ml/Kg	Corazón: Sin alteraciones
6	EAMM 4 g/Kg.	Corazón: Sin alteraciones
7	Solución Twen 80, 5 ml/Kg	Hígado: Sin alteraciones
8	EAMM 4 g/Kg.	Hígado: Sin alteraciones
9	Solución Twen 80, 5 ml/Kg	Pulmón: Sin alteraciones
10	EAMM 4 g/Kg.	Pulmón: Sin alteraciones
11	Solución Twen 80, 5 ml/Kg	Riñón: Sin alteraciones
12	EAMM 4 g/Kg.	Riñón: Sin alteraciones

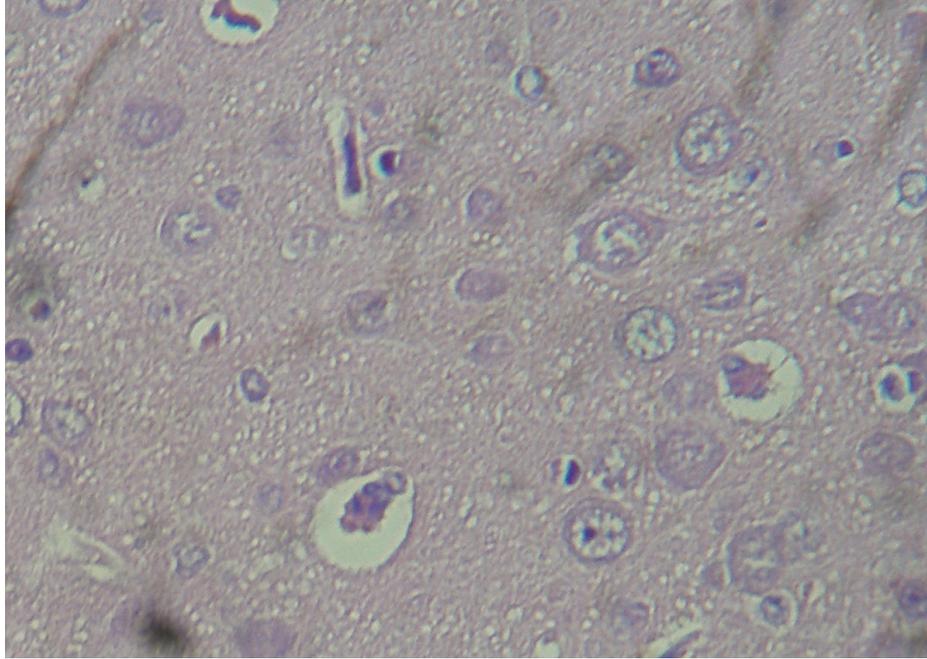


Figura 6. Tejido cerebral, sin alteraciones. Solución Twen 80. (40X).

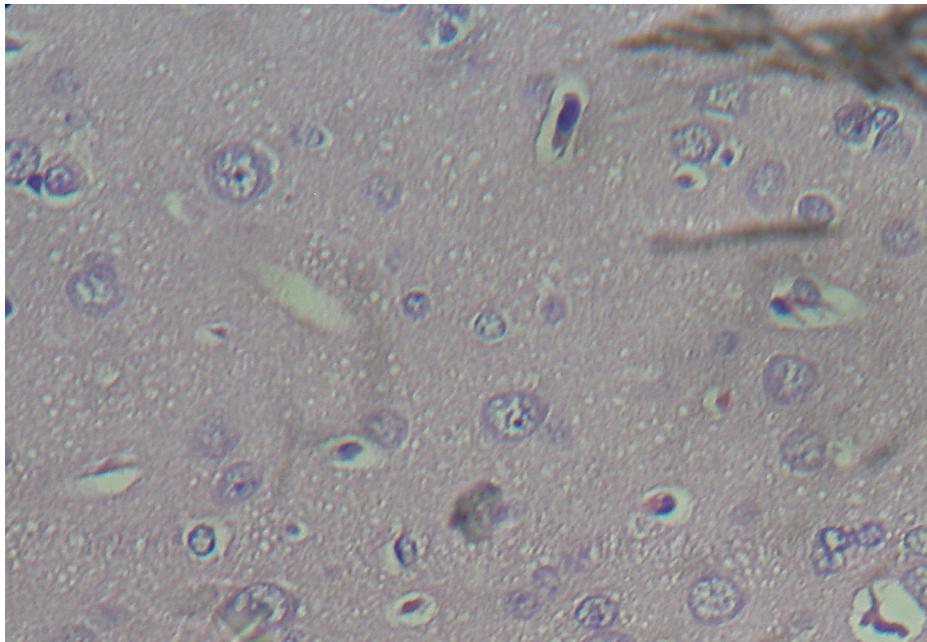


Figura 7. Tejido cerebral, estructuras celulares conservadas. EAMM. (40X).

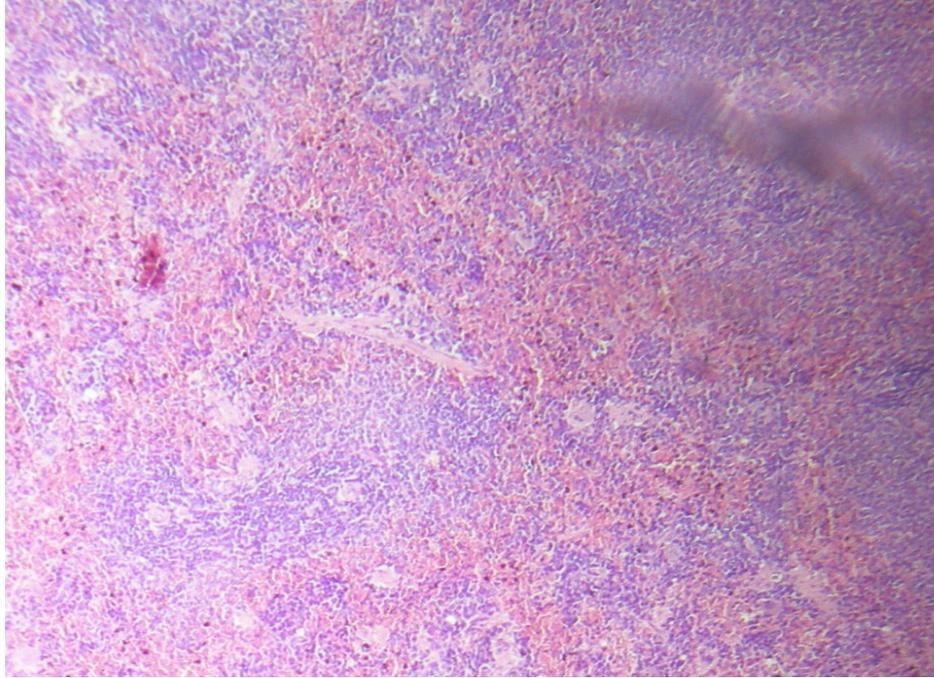


Figura 8. Bazo, sin alteración. Solución Twen 80. (40X).

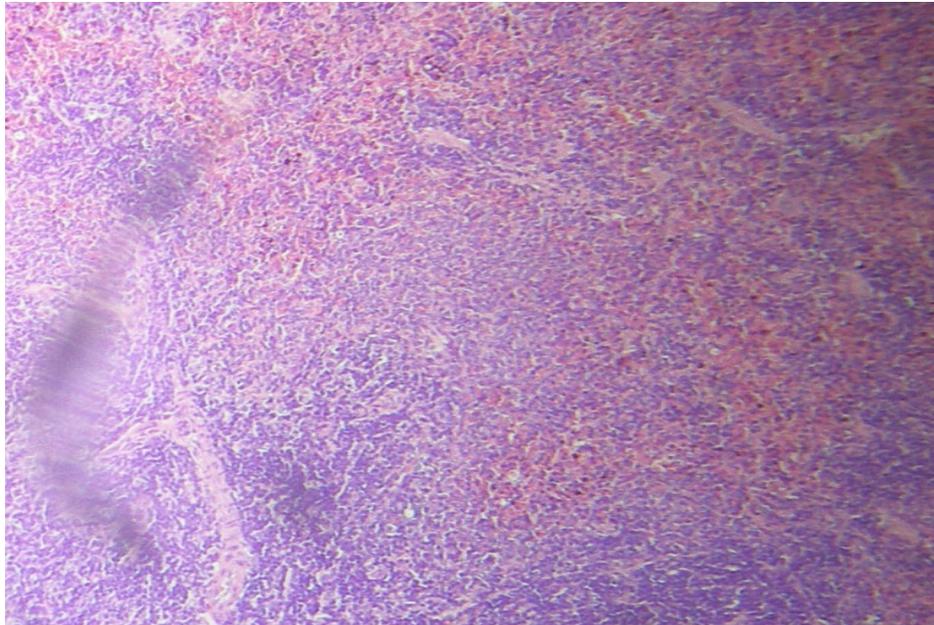


Figura 9. Bazo, estructuras celulares conservadas. EMM. (40X).

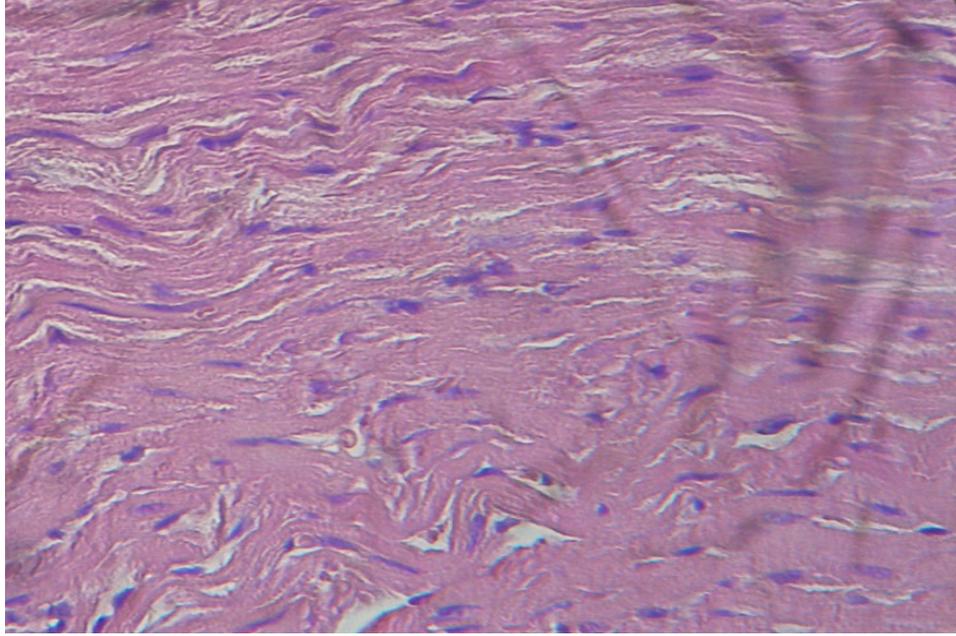


Figura 10. Corazón, sin alteraciones. Solución Twen 80. (40X).

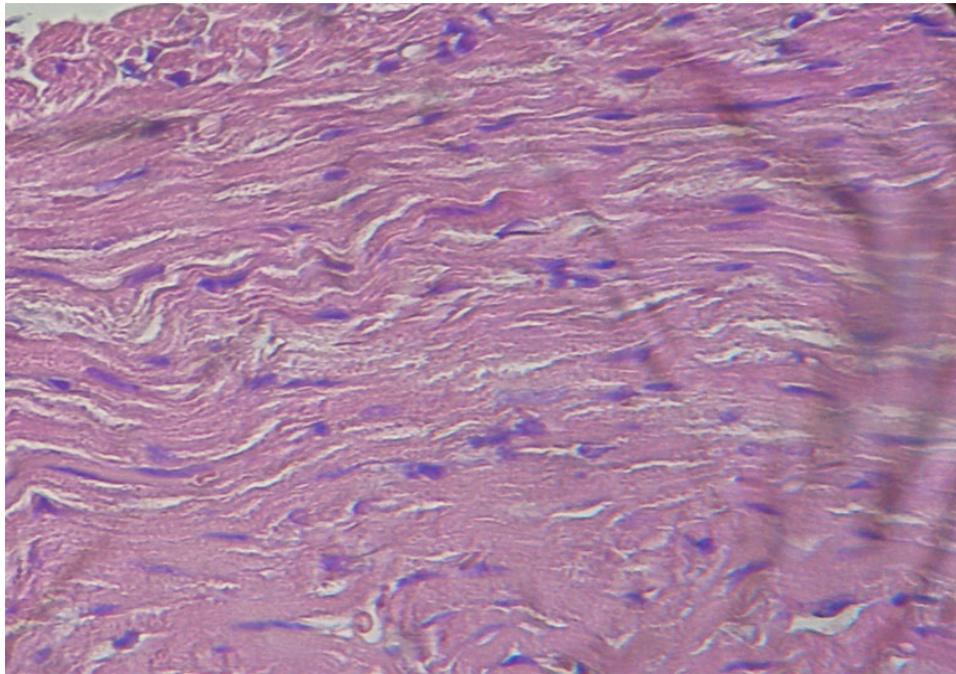


Figura 11. Corazón, estructuras celulares conservadas. EMM. (40X).

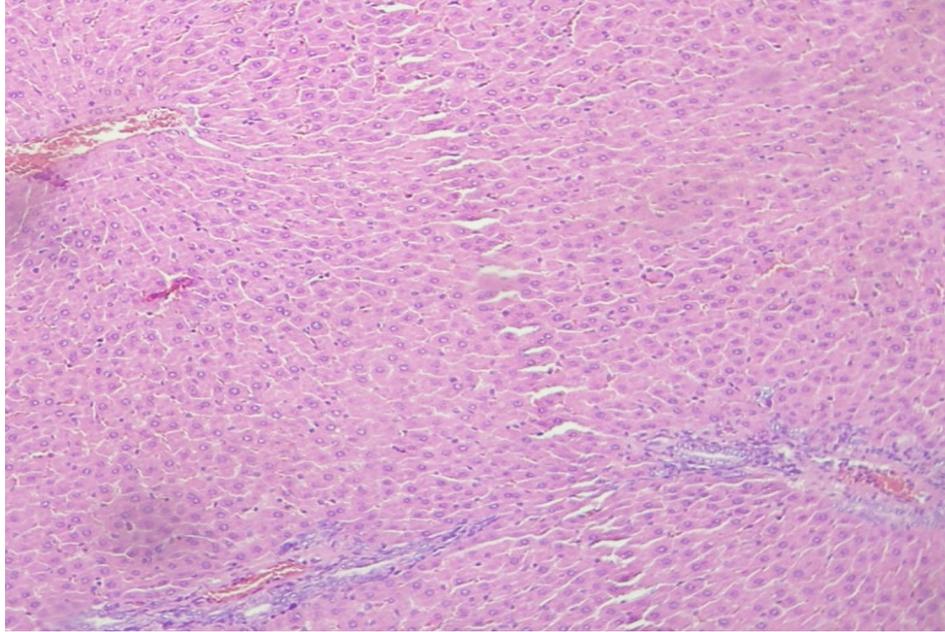


Figura 12. Hígado, sin alteraciones. Solución Twen 80. (40X).

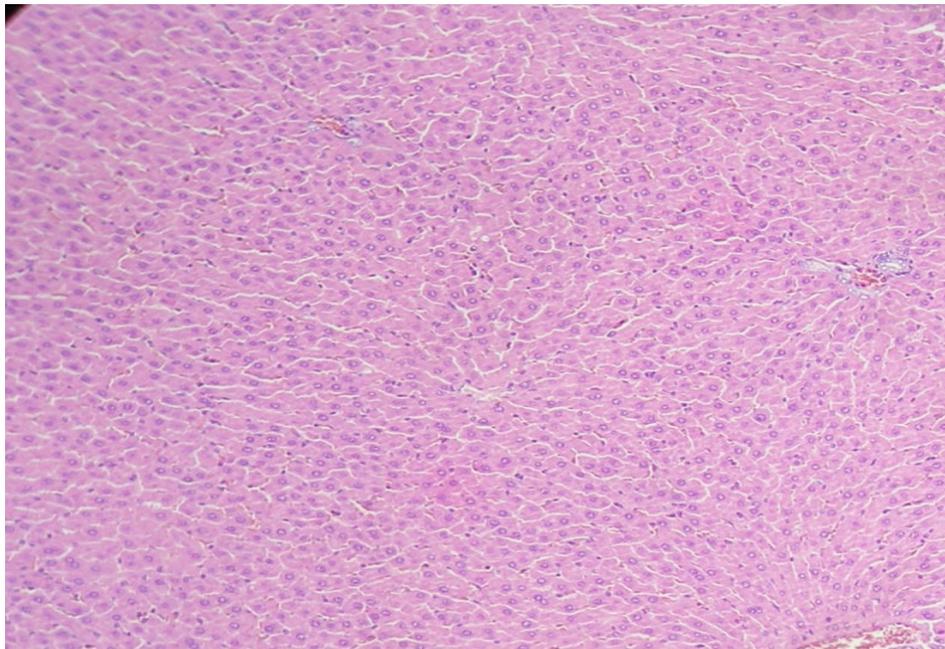


Figura 13. Hígado, estructuras celulares conservadas. EMM. (40X).

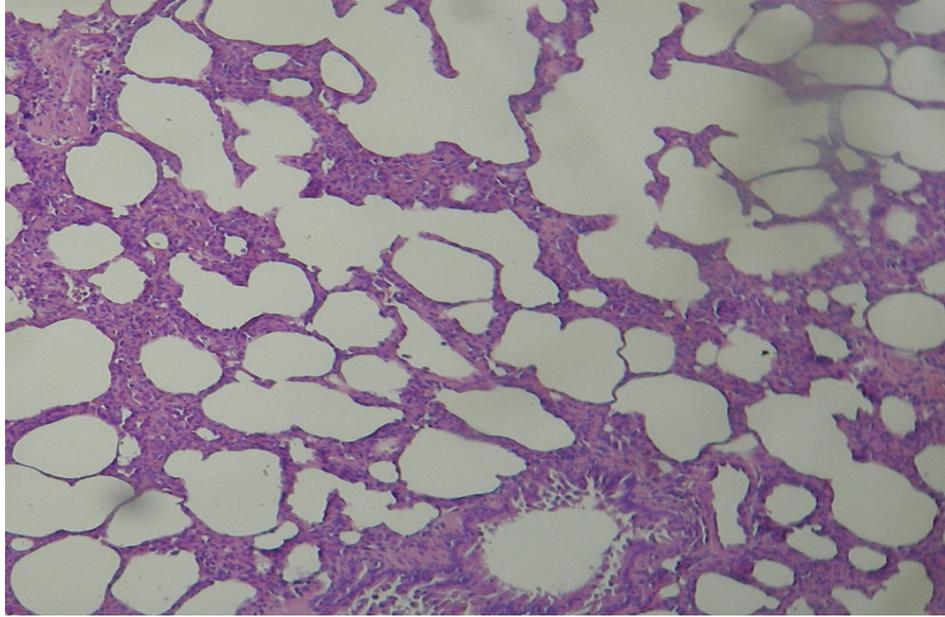


Figura 14. Pulmón, sin alteraciones. Solución Twen 80. (40X).

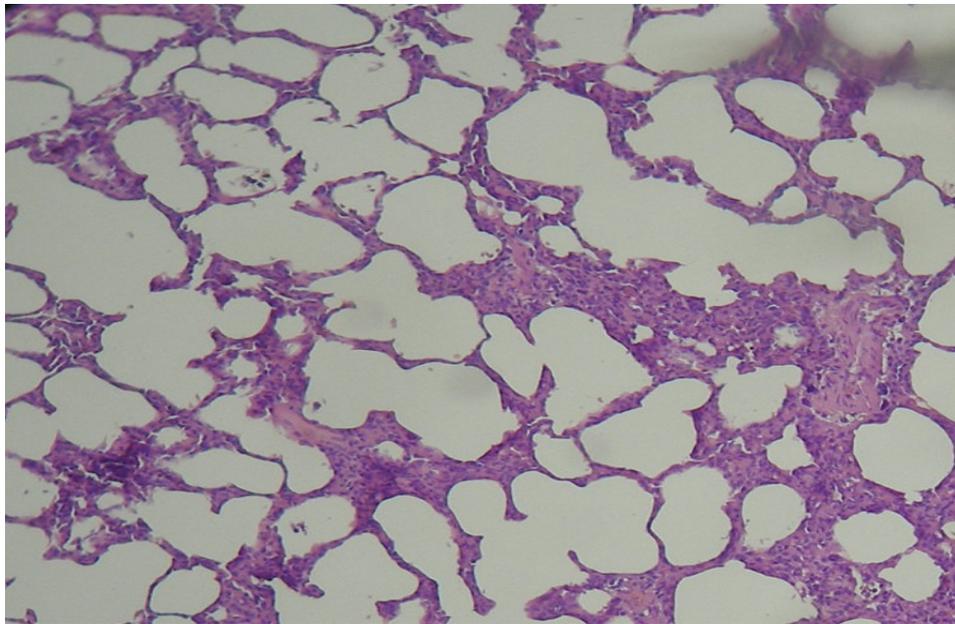


Figura 15. Pulmón, estructuras celulares conservadas. EAMM. (40X).

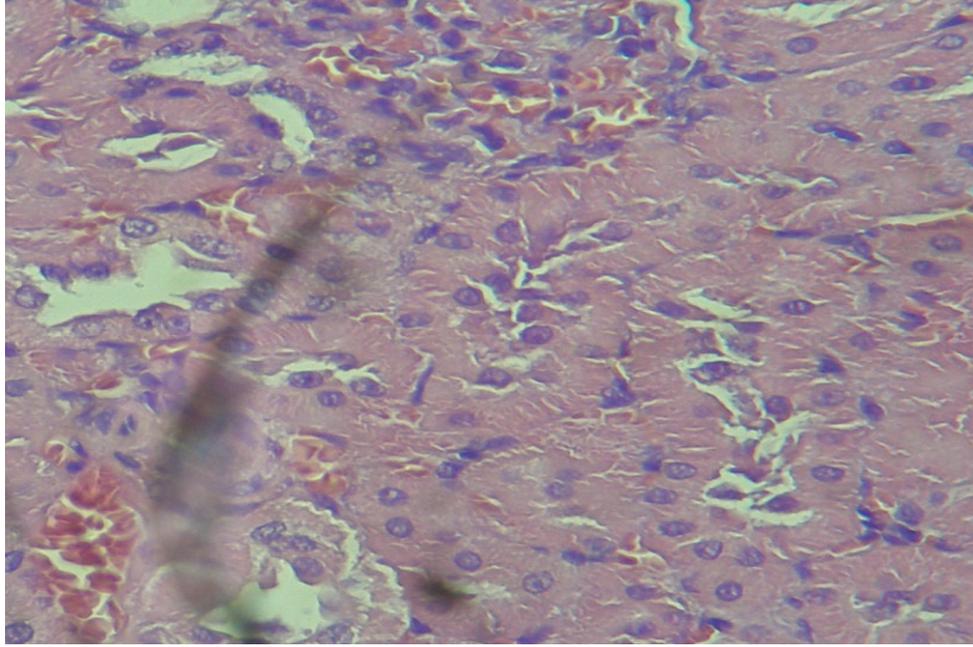


Figura 16. Riñón, sin alteraciones. Solución Twen 80. (40X).

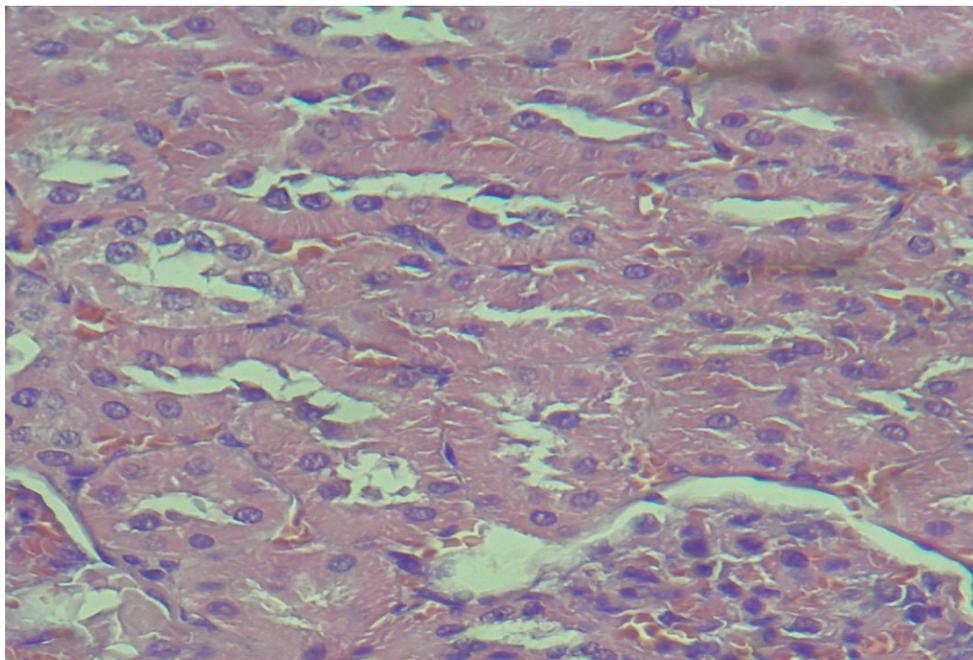


Figura 17. Riñón, estructuras celulares conservadas. EAMM. (40X).

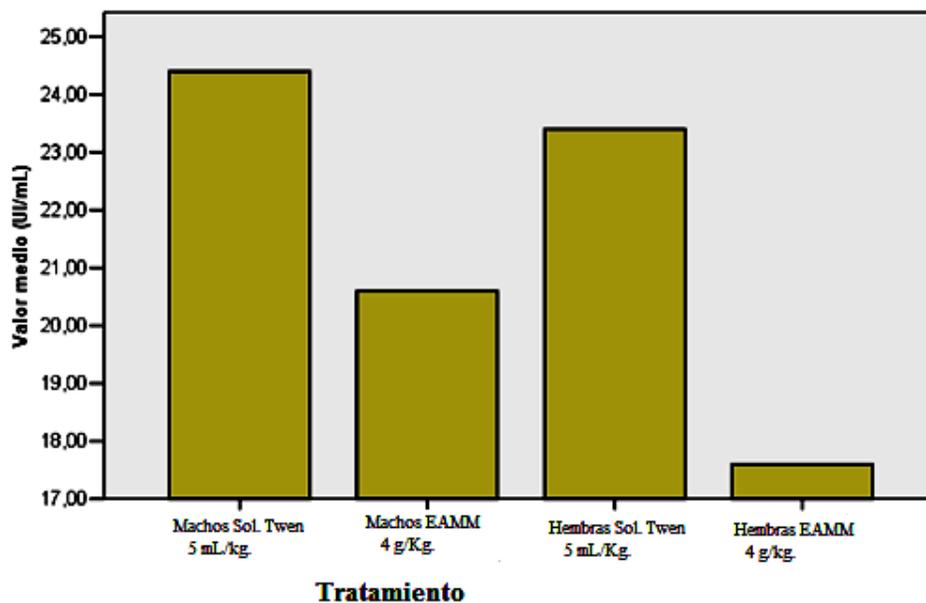


Figura 18. Niveles de urea en plasma de ratas normales luego de 60 días de administración de solución twen 80, 5mL/Kg. y de extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” EAMM, 4 g/Kg. ($p < 0.05$).

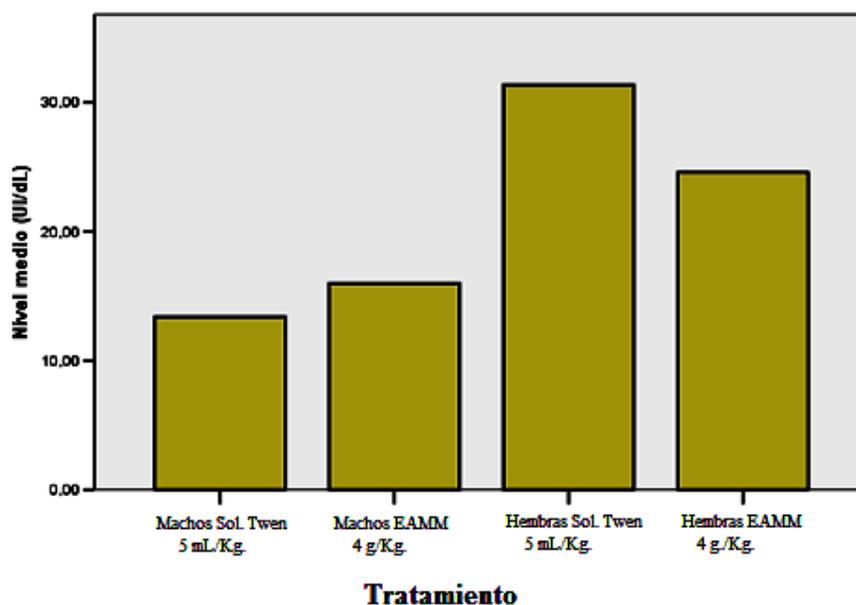


Figura 19. Niveles de TGP en plasma de ratas normales luego de 60 días de administración de solución twen 80, 5mL/Kg. y de extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” EAMM, 4 g/Kg. ($p < 0.05$).

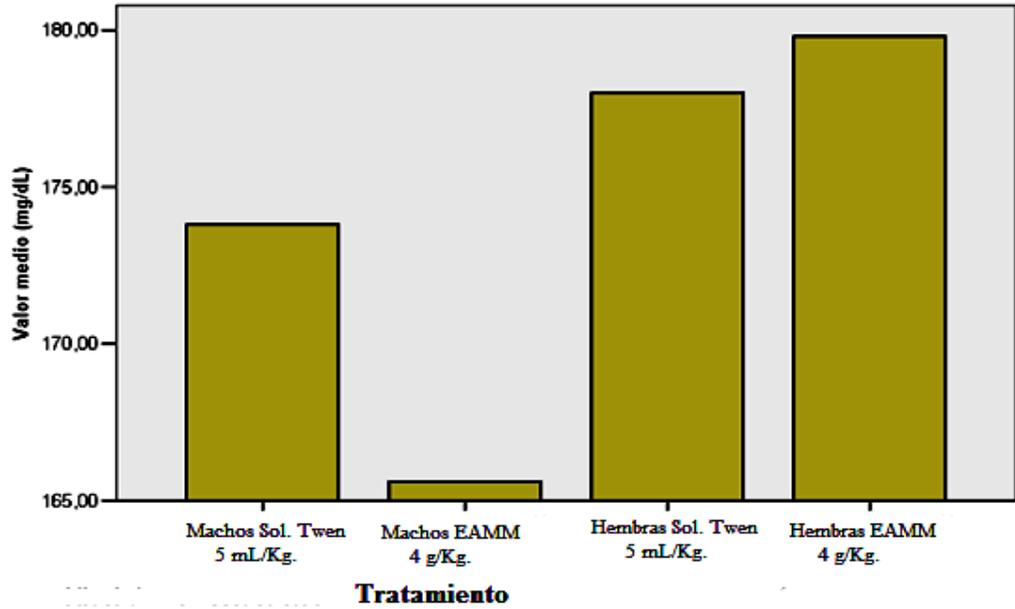


Figura 20. Niveles de colesterol en plasma de ratas normales luego de 60 días de administración de solución twen 80, 5mL/Kg. y de extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” EAMM, 4 g/Kg. ($p < 0.05$).

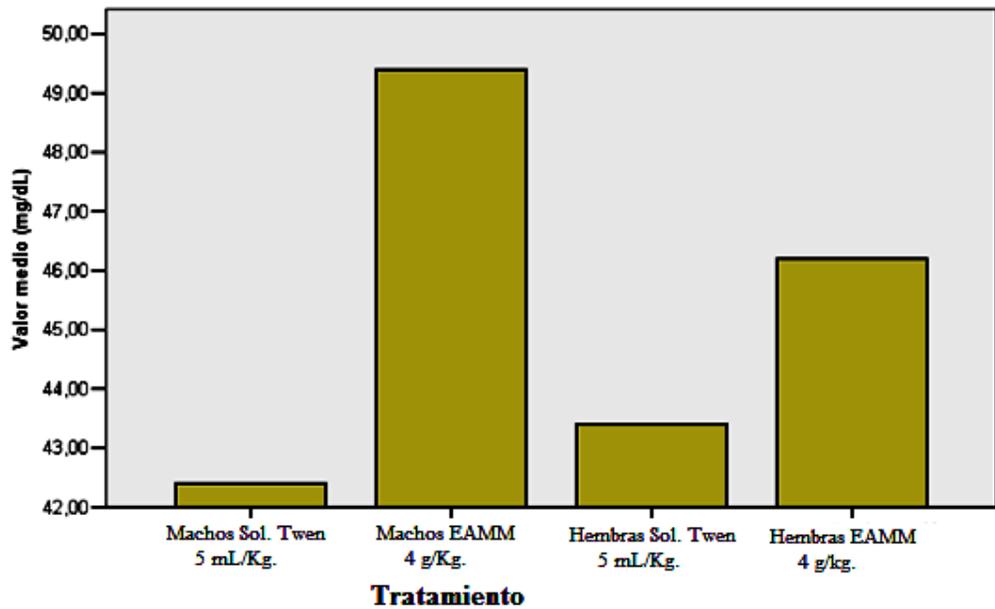


Figura 21. Niveles de HDL en plasma de ratas normales luego de 60 días de administración de Solución Twen 80, 5mL/Kg. y de extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” EAMM, 4 g/Kg. ($p < 0.05$).

Tabla 6. Evolución de pesos durante 8 semanas.

Semana	Tratamiento	Valor	Error	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
		Medio (g)	Estándar D.E. +/-	Límite inferior	Límite superior		
Basal	Machos Solvente 5 mL./kg.	146,2	2,8	138,3	154,1	140	154
	Hembras Solvente 5 mL./kg.	66,8	6,1	49,9	83,7	55	85
	Machos EAMM 4 g./kg.	144,8	4,6	132,1	157,5	128	154
	Hembras EAMM 4 g./kg.	61,6	6,4	43,9	79,3	41	76
Primera	Machos Solvente 5 mL./kg.	156,6	1,7	151,9	161,3	153	162
	Hembras Solvente 5 mL./kg.	82,8	4,9	69,1	96,5	72	97
	Machos EAMM 4 g./kg..	157,2	5,8	141,2	173,2	135	168
	Hembras EAMM 4 g./kg..	81,6	3,4	72,2	91,0	69	88
Segunda	Machos Solvente 5 mL./kg.	166,6	3,1	158,1	175,1	159	174
	Hembras Solvente 5 mL./kg.	95,8	5,1	81,7	109,9	87	115
	Machos EAMM 4 g./kg..	163,8	5,5	148,6	179,0	143	174
	Hembras EAMM 4 g./kg..	94,6	2,4	88,1	101,1	88	100
Tercera	Machos Solvente 5 mL./kg.	180,6	5,0	166,7	194,5	164	192
	Hembras Solvente 5 mL./kg.	103,6	6,5	85,5	121,7	93	129
	Machos EAMM 4 g./kg. .	171,8	3,4	162,3	181,3	160	179
	Hembras EAMM 4 g./kg.	108,4	3,1	99,7	117,1	97	115
Cuarta	Machos Solvente 5 mL./kg.	200	7,1	180,3	219,7	174	213
	Hembras Solvente 5 mL./kg.	113,2	8,8	88,7	137,7	101	148

Los valores están dados en promedio +/- D.E. de 5 ratas en cada grupo comparados con test de diferencia significativa mínima con una $p < 0.05$.

Semana	Tratamiento	Valor	Error	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
		Medio (g)	Estándar D.E. +/-	Límite inferior	Límite superior		
Quinta	Machos EAMM 4 g./kg. .	194,8	7,4	174,3	215,3	179	215
	Hembras EAMM 4 g./kg. .	120,2	3,2	111,2	129,2	112	128
	Machos Solvente 5 mL./kg.	220,2	11,2	189,2	251,2	182	246
	Hembras Solvente 5 mL./kg.	135,6	9,9	108,0	163,2	123	175
Sexta	Machos EAMM 4 g./kg..	217	12,5	182,2	251,8	185	255
	Hembras EAMM 4 g./kg. .	142,4	5,9	126,1	158,7	128	153
	Machos Solvente 5 mL./kg.	236,8	12,6	201,8	271,8	190	261
	Hembras Solvente 5 mL./kg.	156,2	9,1	131,0	181,4	140	191
Séptima	Machos EAMM 4 g./kg. .	239,2	17,8	189,9	288,5	189	290
	Hembras EAMM 4 g./kg..	159,8	7,5	139,0	180,6	141	178
	Machos Solvente 5 mL./kg.	254,2	13,0	218,0	290,4	208	279
	Hembras Solvente 5 mL./kg.	177	9,7	150,1	203,9	164	215
	Machos EAMM 4 g./kg..	252,8	16,9	205,8	299,8	207	300
	Hembras EAMM 4 g./kg. .	177	8,1	154,4	199,6	159	205

Los valores están dados en promedio +/- D.E. de 5 ratas en cada grupo comparados con test de diferencia significativa mínima con una $p < 0.05$.

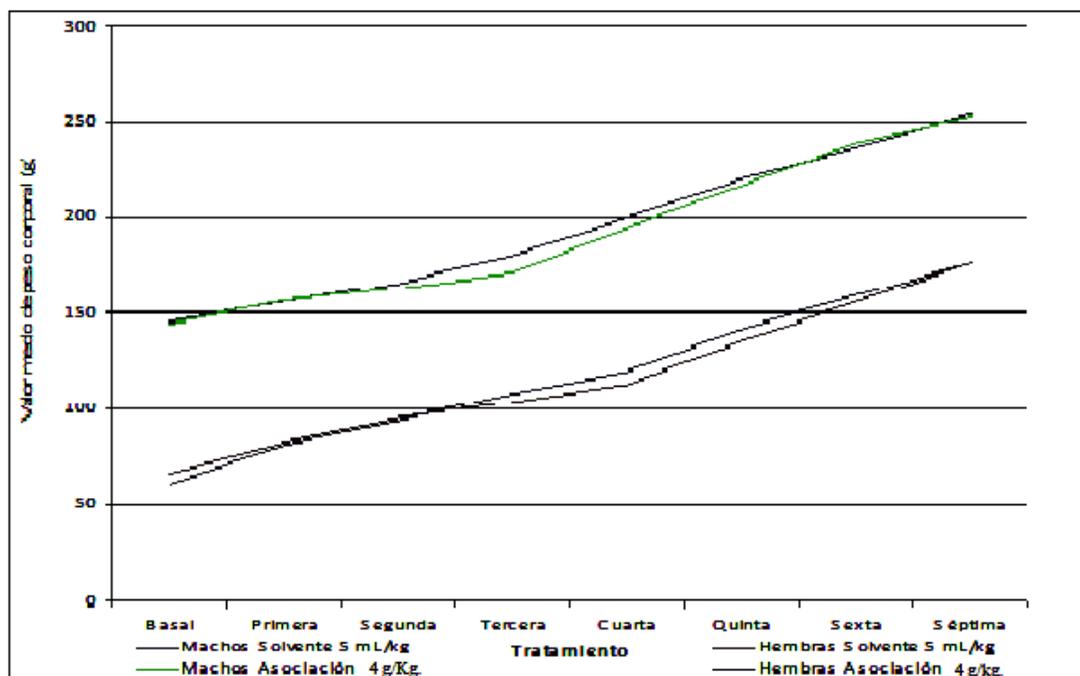


Figura 22. Evolución de pesos durante la administración de la asociación de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” en dosis de 4 g /Kg. y del solvente twen 80, 5 mL/Kg.

DISCUSIÓN

La etnobotánica es la ciencia que estudia el uso popular de la flora de una región y sus propiedades curativas de la planta, tal es así que las plantas utilizadas en el estudio, *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” refieren ser requeridos por la población por sus propiedades tranquilizantes. Huamán (1996). El “Screening” fitoquímico, llamado también marcha fitoquímica o tamizado fitoquímico, es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos de la planta. (Domínguez, 1979).

En la (Tabla 1) se muestran las concentraciones importantes de los compuestos fenólicos y flavonoides del extracto alcohólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” esto se debería a la presencia de un flavonoide muy importante en la composición química de la Manzanilla, que es la Apigenina, que también fueron encontrados en estudios anteriores al nuestro. (Della LLogia, et al 1981).

La (Tabla 1) hace referencia a la importante cantidad de compuestos terpenicos dentro del extracto presente en *Matricaria chamomilla* “Manzanilla”, las concentraciones halladas son relevantes y esto se debería a la presencia de compuestos terpenoides, matricin, proazulenos como el alfa bisabolol, los cuales nos permiten reforzar los hallazgos realizados en estudios previos. (Pirzard, et al 2006).

La colina un compuesto químico importante muchas veces considerado nutriente vital y muy bien distribuidos en otros compuestos tales como los mucilagos, en la (Tabla 1) se evidencia relativas concentraciones de mucilagos y azucares lo que podríamos asumir por la presencia de colina en el extracto alcohólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla”, lo cual contrasta con otros estudios realizados anteriormente. (Pirzard, et al 2006).

El citronnelal o dehidrogeraniol es un monoterpenoide de origen natural, estudios anteriores demuestran que mencionado terpenoide se encuentra en concentraciones muy considerables en el extracto de *Melissa officinalis* "Toronjil" lo mismo sucede con otro metabolito secundario como el eugenol a los cuales se les atribuye acciones sedativas pues evidencian interacción y afinidad con los receptores GABA-A; como muestra la (Tabla 2), nuestro extracto alcohólico evidencia concentraciones relevantes de esteroides y triterpenos, también se muestra relevancia en compuestos fenólicos y esto se debería a un compuesto fenólico muy importante como lo es el eugenol a los cuales se les atribuye propiedades sedantes. (Aoshima 1999)

El ácido rosmarínico es considerado un compuesto fenólico al cual se le atribuye propiedades ansiolíticas por la interacción con el receptor implicado en la génesis de los estados de ansiedad, en el presente estudio al realizar la marcha fitoquímica se encontraron concentraciones considerables de compuestos fenólicos como muestra la (Tabla 2) por lo cual reafirmamos los efectos ansiolíticos del extracto alcohólico de *Melissa officinalis* "Toronjil" (Pereira, et al 2005)

La (Tabla 2) muestra la presencia de flavonoides en pequeñas cantidades en nuestro extracto alcohólico de *Melissa officinalis* "Toronjil" esto se debería a la presencia de luteolin-3'-O-beta-glucorónido un flavonoide con ciertas propiedades antioxidantes, lo cual reafirma estudios anteriores realizados en el extranjero. (Heitz, et al 2000)

La (Tabla 2) evidencia la presencia de azúcares en el extracto alcohólico de *Melissa officinalis* "Toronjil", esto se debe a la presencia de mucilagos presentes en la planta dentro de estos mucilagos resalta la presencia de colina y nos permite reafirmar estudios anteriores al nuestro (Wake, et al 2000).

Los hallazgos encontrados en el presente estudio nos evidencia el aumento de concentración de los compuestos fenólicos, de compuestos terpenicos, flavonoides y de mucilagos (Tabla 1) presente en el extracto alcohólico de “Manzanilla” que posterior a la asociación con el extracto alcohólico de “Toronjil” aumento considerablemente su concentración (Tabla 3), esto se debería al efecto de suma que presentan los metabolitos secundarios sujetas a estudio, el cual podría ser el responsable del efecto sedante encontrado. (Solinas et al, 1996).

El estudio fitoquímico del extracto alcohólico de las hojas y flores *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” ha evidenciado regular cantidad de compuestos polifenólicos y compuestos esteroides y triterpenos (Tabla 3), por lo que se hace necesario mayores investigaciones al respecto, para conocer si estaría presente el compuesto monoterpénico: citral (geranial + neral) del “Toronjil” y diversos sesquiterpenos con esqueleto bisabolano de la “Manzanilla”, y así explicar los postulados anteriores. (Soulimani et al, 1991; Perry et al, 1996).

Es posible que los compuestos polifenólicos y compuestos triterpenoides presentes en el extracto alcohólico de las hojas y flores de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” (Tabla 3) contribuyan en mejorar los estados de ansiedad y estrés. (Mann et al, 1992).

La activación de los receptores inotrópicos de NMDA son estimulados con su neurotransmisor glutamato y también por parte de un agonista correspondiente, en el presente estudio es NMDA provocando una serie de flujo de iones en estos receptores donde resalta la entrada de los iones Na^+ y Ca^+ y salida de los iones K^+ de las células neuronales manifestándose hiperactividad de estas células, que se evidencia con hiperactividad y cambios en la conducta dosis dependiente que pueden llevar a la epilepsia. En el ensayo de hiperactividad y cambios conductuales como muestra la (Figura 1) se utilizó DAP-7 un antagonista de NMDA como control positivo; quedando reflejado que el EAMM a 4 g. /Kg posee el mismo porcentaje de protección que el antagonista DAP-7, esto se debería a que compuestos

presentes en el EAMM estarían interactuando con los receptores de NMDA estimulados, desplazando a su agonista y mejorando los estados de conducta, además que se debería a sus compuestos terpenicos como citronelal y alfa bisabolol que estarían presente en el EAMM. Los datos también sugieren, como muestra la (Figura 2), la disminución en el tiempo de latencia de los cambios conductuales evidenciados con hiperactividad de los animales de experimentación se debería a la interacción de los flavonoides apigenina y luteolin-3'-O-beta-glucorónido. (Abuhamdah, et al 2008).

Con los hallazgos podríamos postular como muestra la (Figura 3) una dosis efectiva 50 (DE50) de 3198.00 mg. / Kg. del extracto alcohólico de hojas y flores de *Melissa officinalis* "Toronjil" más *Matricaria chamomilla* "Manzanilla", ejerce efectos tranquilizantes sobre la hiperactividad y los cambios conductuales inducidos con NMDA. Esto se debería a la participación de sus metabolitos secundarios en suma por la asociación de estas 2 plantas al administrarse a los animales de experimentación.

El GABA es un receptor que está implicado en el origen de estados de ansiedad, puesto que su interacción con determinados ligandos generan estados ansiolíticos como sucede con el diazepam en el presente estudio; nuestro estándar farmacológico la (Figura 4) muestra la potenciación por estimulación de los receptores GABA reflejados en el tiempo de dormir por parte de los ratones a los cuales se les administró diazepam mas EAMM, donde observamos que el tiempo de dormir son muy considerables en aquellos que recibieron diazepam mas EAMM, esto se debería a la participación de los metabolitos secundarios como , eugenol, ácido rosmarinico, apigenina, y colina que estarían interactuando con el receptor GABA produciendo efectos ansiolíticos reflejados en el tiempo de dormir. (Aoshima y Hamamoto 1999), (Avallone, et al 2000).

Con los hallazgos descritos, se postula que el extracto alcohólico de las hojas y flores de *Melissa officinalis* "Toronjil" más *Matricaria chamomilla* "Manzanilla" posiblemente actuaría directamente interactuando con el receptor GABAa inhibiendo la liberación de serotonina cuando estos valores

se encuentran demasiados altos, permitiendo la disminución de los estados de ansiedad. Por otro lado, al administrar el extracto alcohólico de las hojas y flores de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” en ratones normales se desarrollaría el efecto sedante (Figura 2), posiblemente por metabolitos secundarios presentes en las plantas (Tabla 3), que actuarían a nivel del receptor GABA_A (Wolfman et al, 1994).

En la (Tabla 5) evaluación de la toxicidad crónica por vía peroral del extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” no presentó mortalidad así, como también no presentó cambios significativos en los tejidos analizados postmortem a dosis de 4 g/Kg., que es considerado límite para los estudios de toxicidad crónica oral. El extracto alcohólico de hojas y flores de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” se considera no toxica ya que no presenta una mortalidad mayor a la dosis estudiada estando en el rango de no clasificado como lo muestra el método para toxicidad crónica en ratas. (OECD, 1996).

La insuficiencia renal crónica es el resultado de la destrucción progresiva e irreversible de las nefronas, esto sucede cuando un organismo vivo se somete a numerosos agentes tóxicos que puedan causar daño renal así como también a muchas enfermedades una de ellas por ejemplo la diabetes mellitus, esta destrucción produce hipertrofia estructural y funcional de las nefronas. (Brenner, 1993). Como muestra la (Figura 18) los valores para urea se encuentran dentro de los niveles normales e inclusive muestran un ligero descenso de las concentraciones medidas, en el grupo de animales expuestos a toxicidad crónica, esto se debería a la presencia de un metabolito presente en el extracto que sería colina, el cual ha demostrado que en concentraciones bajas en un organismo vivo causa lesiones renales acompañadas de daño ocular, y sucede lo contrario cuando los niveles de colina se encuentran estables o en concentraciones considerables. Nuestro extracto proporcionaría concentraciones adecuadas de colina aunque falta realizar estudios que demuestren este efecto. (Ossani, et al 2006).

Las transaminasas son indicadores de la función hepática sobre todo del nivel de necrosis de los hepatocitos (Soza, 2004). El nivel normal de TGP de una rata sana es de 38 UI/dl. (Troncozo, 2007), en nuestro estudio, así como en otros, los niveles de transaminasas se elevan por la presencia de un agente hepatotóxico. Estudios de toxicidad con tetracloruro de carbono demuestran que se elevan los niveles de transaminasas, cuando existe lesión de los hepatocitos. (EMEA, 1999). Como se muestra en la (Figura 19) los valores de TGP de los animales que recibieron la asociación del extracto sujeta a estudio durante 60 días, no mostraron alteraciones de los niveles de TGP, esto se debería a que el extracto posee metabolitos secundarios como flavonoides antioxidantes que mejorarían la función hepática aunque falta realizar estudios para demostrar el mecanismo de acción por la cual se estarían evidenciando este efecto.

En la (Figura 20) se observa valores de colesterol de significancia en los animales machos a diferencia de las hembras esto se debería al sistema hormonal, en la (Figura 21) muestran los valores de HDL que después de la administración crónica muestran que los niveles han sido elevados considerablemente con respecto al grupo control, esto se debería a que los metabolitos presentes en el extracto asociado elevan el HDL en este ensayo de toxicidad crónica. (OECD, 1996).

El extracto alcohólico de hojas y flores de *Melissa officinalis* "Toronjil" más *Matricaria chamomilla* "Manzanilla" presenta actividad sedante a dosis de 4 g/Kg este efecto se explicaría por la suma de los metabolitos secundarios de ambas plantas entre ellos compuestos terpenicos, fenólicos, flavonoides y mucilagos como la colina, como se muestran en la (Tabla 3), dado a que los compuestos terpenicos como citral, citronellal, eugenol, ácido rosmarico, alfa bisabolol, matricin, flavonoides como apigenina, estarían interactuando con los receptores GABA evidenciando efectos sedantes ansiolíticos. (Aoshima y Hamamoto 1999), (Avallone, et al 2000). Así como también importante participación en el desplazamiento del glutamato neurotransmisor, por competencia sobre los receptores de NMDA implicado en la génesis de la hiperactividad, por parte de mencionados metabolitos, reflejándose una

considerable disminución de los estados de hiperactividad como lo muestra la (Figura 2). (Abuhamdah, et al 2008).

En el presente estudio se hace referencia a *Matricaria chamomilla* “manzanilla” pero sin embargo como muestra el certificado de taxonomía emitido por el museo de historia natural, hace referencia a *Matricaria reculita* “manzanilla” esto se debe a que ambos nombres científicos son sinónimos y por lo tanto al referirnos a uno de ellos, sabremos que estamos identificando a ambos de la misma manera. (Ríos, et al 2008).

El extracto alcohólico de *Melissa officinalis* “Toronjil” más *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” no poseen efectos tóxicos y su actividad sedante ha sido demostrada por los pobladores que usan este extracto en estados de preocupación como también para poder conciliar el sueño. Los estudios preclínicos y clínicos pueden ampliar el campo de acción, extendido en formas farmacéuticas tales como tinturas, jarabes o capsulas.

CONCLUSIONES

1. El estudio fitoquímico cualitativo del extracto alcohólico de hojas y flores de *Melissa officinalis* "Toronjil" más *Matricaria reculita* "Manzanilla" muestran que de manera individual poseen considerables metabolitos, pero una vez asociadas estas aumentan considerablemente indicando la presencia abundante cantidad de compuestos terpenicos, compuestos fenólicos, seguido de mucilagos y flavonoides.
2. El extracto alcohólico de hojas y flores de *Melissa officinalis* "Toronjil" más *Matricaria chamomilla* "Manzanilla" en condiciones experimentales al administrarse por vía oral, presenta actividad sedante sobre la ansiedad inducida a dosis de 4 g/Kg. Mostrando una (DE50) de 3198.00 mg. /Kg.
3. La administración por vía oral en animales de experimentación del extracto alcohólico de hojas y flores de *Melissa officinalis* "Toronjil" más *Matricaria chamomilla* "Manzanilla" evidencian efectos sedantes al ser comparado con el estándar farmacológico diazepam.
4. El estudio de toxicidad crónica en ratas, del extracto alcohólico de hojas y flores de *Melissa officinalis* "Toronjil" más *Matricaria chamomilla* "Manzanilla" demostró que la dosis letal 50 (DL 50) es mayor a 2000 mg/Kg. Además de no mostrar alteraciones patológicas en los estudios bioquímicos realizados.

RECOMENDACIONES

1. La procedencia de las plantas durante un estudio experimental deben de ser de un lugar conocido puesto que se ha demostrado que, pueden pertenecer al mismo grupo de familia pero de diferentes zonas de cultivo; estas variaran sus concentraciones de metabolitos secundarios de acuerdo a la zona de cultivo.
2. Las técnicas de preparación del extracto vegetal deben de realizarse según los métodos establecidos que permitan garantizar la adecuada extracción de los metabolitos secundarios y su máxima concentración que será administrada a los animales de experimentación.
3. Si bien es cierto en el presente estudio los métodos utilizados para demostrar el efecto sedante y/o tranquilizante han sido descrito por autores en otros trabajos de investigación se debería buscar nuevos métodos que permitan evaluar el efecto sedante de un extracto vegetal administrado a animales de experimentación.
4. Los ensayos de toxicidad, deben ajustarse a las adecuadas técnicas de recolección de muestras, porque un mal manejo de los órganos obtenidos, podrían proporcionar datos erróneos a una investigación

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abuhamdah, S., Huang, L., Elliott, M., Howes, M., Ballard, C., Holmes, C., et al. (2008). Pharmacological profile of an essential oil derived from *Melissa officinalis* with anti-agitation properties: focus on ligand-gated channels. *J Pharm Pharmacol*, 60 (3): 377–84.
2. Adzet, T., Camarasa, J., Laguna, J. (1987). Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl₄ toxicity in isolated rat hepatocytes. *J. Nat. Prod*, 50: 612–619.
3. Aliaga, K., Gonzáles, S., Solís, R. (2009). Fallecimiento temprano de padres y ansiedad o depresión ulterior en adultos de la sierra peruana: Cajamarca-Ayacucho-Huaraz 2003. Informe de Investigación.
4. Aoshima, H., Hamamoto, K. (1999). Potentiation of GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. *Biosci Biotechnol Biochem* 63 (4): 743–748.
5. Apak, R., Güçlü, K., Ozyürek, M., Esin- Karademir S., Erçağ, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *Int J Food Sci Nutr*, 57 (5): 292–304.
6. Avallone, R., Zanolli P., Corsi, L., Cannazza, G., Beraldi M. (1966). Benzodiazepine-like compounds and GABA in flower heads of *Matricaria chamomilla*. *Phytotherapy Research* 10: 177-179.
7. Avallone, R., Zanolli, P., Puia G., Kleinschnitz, M., Schreier P., Baraldi M. (2000). Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochem Pharmacol*, 59 (11): 1387-94.
8. Ballard C., O'Brien J., Reichelt, K., Perry, E. (2002). Aromatherapy as a safe and effective treatment for the management of agitation in severe dementia: the results of a double-blind, placebo-controlled trial with Melissa. *J Clin Psychiatry* 63 (7): 553-558.
9. Battaglia, M., Ogliari, A. (2005). Anxiety and panic: from human studies to animal research and back. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29:169-179.

10. Beretz, A., Hagg-Berruie, M., Anton R. (1978). Choix de méthodes pharmacologiques pour l'étude des activités de l'aubépine. *Plantes médicinales et phytothérapie*. 4: 305-314.
11. Bermúdez, D., Monteagudo E., Boffil M., Díaz, L., Roca A., Betancourt E., et al. (2007). Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo. REDVET. *Revista electrónica de Veterinaria*, 8 (3): 1695-7504.
12. Brain, F., McAllister H., Walmsley V. (1989). Drug effects on social behaviour. *Neuromethods*. New Jersey. pp 687-739.
13. Brenner, B., Lazarus, J. (1993). *Acute renal Failure*. 3d ed. New York, Churchill Livingstone.
14. Briceño, R. (1974). Estudio fitoquímico y extracción del aceite esencial de las hojas de la especie *Melissa officinalis*. Tesis para Optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Trujillo-Perú. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo.
15. Brown T., O'Leary T., Barlow D. (2001). Generalized anxiety disorder. En D.H. Barlow (Ed.), *Clinical handbook of psychological disorders: A step-by-step treatment manual*. Nueva York: Guilford. pp. 154-208.
16. Bruneton J. *Farmacognosia, Fitoquímica Plantas Medicinales*. Ed. Acribia 2ª Edición. 2001. p. 524-526, 514-519.
17. Centro de Investigación de la Producción Industrial CIPI. (1998). Universidad de Lima, Facultad de Ingeniería "Industrialización de plantas Medicinales". pp. 30-40
18. Chopin, P., Briley M. (1987). Animal models of anxiety: the effect of compounds that modify 5-HT neurotransmission. *Trends Pharmacol. Sci.*, 8, 383-388.
19. Comte, A. (1973). *Curso de Filosofía Positiva*, Editorial Aguilar Argentina S.A., Buenos Aires-Argentina. pp 75.
20. Croucher J., Collins J., Meldrum, B. (1982). Anticonvulsant action of excitatory amino acids antagonists. *Science*, 216: 899-902.

21. De Lope, C. (2007). *Psiquiatra. Clínica de la Ansiedad. Tratamiento de la ansiedad en Barcelona y Madrid.*
22. Della Loggia, R., Tubaro A., Redaelli C. (1981) Evaluation of the activity on the mouse CNS of several plant extracts and a combination of them. *Riv Neurol*, 51.5: 297–310.
23. Dominguez, B. (1998). “Bilateral Skin Temperature as an Index of Disclosure with Chronic Pain Pediatric Patients”, *Applied Psychophysiology and Biofeedback*, 23(2), 113.
24. EMEA/MRL. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit – final July; 548(14):99.
25. Fisher R. (1989). Animals models of the epilepsies. *Brain Res. Rev*, 14: 245-278.
26. Flinday, G., Wick, M., Mascia, M., Millier, G., Harris, R., Blednov, Y. (2002). Transgenic expression of a mutant glycine receptor decreases alcohol sensitivity of mice. *J. Pharmacol. Exptl. Ther*, 300: 526-534.
27. Flores, J. (1998). *Farmacología Humana*. Ed. Edil Masson S.A., 3ª Edición.
28. Goma, A., Hashem, T., Mohamed, M., Ashry, E. (2003). *Matricaria chamomilla* extract inhibits both development of morphine dependence and expression of abstinence syndrome in rats. *J Pharmacol Sci*, 92. (1): 50–5.
29. Greden, F. (1974) Anxiety or caffeinism: a diagnostic dilemma, *American*.
30. Gross, C., Hen, R. (2005). The development origins of anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, 5: 545-552.
31. Hartisch, C., Kolodzeeij, H., Von Bruchhausen, F. (1997). Dual inhibitory activities of tannins from *Hamamelis virginiana* and related on 5-lipoxygenase and lyso-PAF. Acetyl-CoA acetyltransferase. *Planta Médica*, 63(2): 106-110.
32. Heitz, A., Carnat, A., Fraise, D., Carnat, A., Lamaison, J. (2000). Luteolin 3'-glucuronide, the major flavonoid from *Melissa officinalis* subsp. *officinalis*. *Fitoterapia. Apr*, 71 (2): 201-2
33. Hernández, R. (1998). *Metodología de la Investigación*. Segunda Edición. Mc Graw – Hill Interamericana. México.

34. Huamán J. (1996). Evaluación de *Melissa officinalis* (toronjil) como cardiotónico en insuficiencia cardiaca experimental. Tesis para Optar el Título Profesional de Médico-Cirujano. Cuzco-Perú. Facultad de Medicina. Universidad Nacional san Antonio Abad del Cuzco-Perú.
35. Instituto Especializado de Salud Mental “Honorio Delgado – Hideyo Noguchi”. (2002). Estudio epidemiológico metropolitano en salud mental. Informe general. Lima: IESM HD-HN.
36. Instituto Especializado de Salud Mental “Honorio Delgado – Hideyo Noguchi”. (2003). Estudio epidemiológico en salud mental en la sierra peruana 2003. Lima: IESM HD-HN.
37. Instituto Especializado de Salud Mental “Honorio Delgado – Hideyo Noguchi”. (2004). Estudio epidemiológico en salud mental en la selva peruana 2004. Lima: IESM HD-HN.
38. Kazuaki, S., Toshio, I., Yoshiaki, U., Shin, T., Takayoshi, M., Asae, O., et al. (2005). Hypnotic activities of chamomile and passiflora extracts in sleep-disturbed rats. *Biol. Pharm Bull*, 28: 808-810.
39. Kendler, K., Neale, M., Kessler, K., Heath, A., Eaves, L. (1992). The genetic epidemiology of phobias in women: The interrelations of agoraphobia, social phobia, situational phobia, and simple phobia. *Archives of General Psychiatry*, 49, 273-281.
40. Kennedy, D., Little, W., Haskell, C., Scholey, A. (2006). Anxiolytic effects of a combination of *Melissa officinalis* and *Valeriana officinalis* during laboratory induced stress. *Phytother Res*, 20. 2: 96–102.
41. Kennedy, D., Wake, G., Savelev, S., Tildesley, N., Perry E., Wesnes, K., et al (2003). Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of single doses of *Melissa officinalis* (Lemon balm) with human CNS nicotinic and muscarinic receptor-binding properties. *Neuropsychopharmacology*, 28.10: 1871–81.
42. Kennedy D., Scholey A., Tildesley N., Perry E., Wesnes K. (2002). Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of *Melissa officinalis* (lemon balm). *Pharmacol Biochem Behav.*; 72 (4):953-64.
43. Comisión E. Monograph. Melissenblätter; Bundesanzeiger. (1984); 5: 12-16.

44. Kuklinski C. (2003). Farmacognosia. Ediciones Omega S.A. Plató 26-08006 Barcelona. p. 271-276.
45. Lobo, A., Campos, R. (1997). Factores etiopatogénicos. En: Trastornos de ansiedad en atención primaria. Madrid: Editorial EMISA; pp.41-76.
46. Lock De Ugaz O. (1988). Investigación Fitoquímica – Métodos en el estudio de Productos Naturales. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima.
47. Lock Sing, O. (1999). Registro y control de calidad de recursos y productos naturales de uso en salud. Pontificia Universidad Católica Del Perú Fondo Editorial. Lima.
48. López-Ibor, J., Valdés, M. (2004). editores. DMS-IV-TR-AP. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. Texto revisado. Atención Primaria. Barcelona: Masson.
49. Manelic, R., OrtegaSoto H. (1995). La depresión en los estudiantes universitarios de la escuela nacional de estudios profesionales plantel de Aragón. *Salud Mental*. 18 (2) 31 – 34.
50. Mann, C., Staba, E. (1992). The chemistry pharmacology and commercial formulations of chamomile. In: Craker, L. E. and J. E. Simon (Eds.). Herb, Spice and Medicinal Plants. Recent Advances in Botany, Horticulture and Pharmacology. *Food Product Press*, New York, USA. 1: 235-280.
51. Mann, C., Staba, E. (2002). The chemistry, pharmacology and commercial formulations of chamomile. In: Craker LE, Simon JE, editors. Herbs, spices and medicinal plants- recent advances in botany, horticulture and pharmacology. USA: *Haworth Press Inc*; pp. 235–80.
52. Mantle, D., Eddeb, F., Pickering, A. (2000). Comparison of relative antioxidant activities of British medicinal plant species in vitro. *J Ethnopharmacol* 72: 47–51.
53. Martín-Lopez, M., Navarro, J. (1999). Efectos de la administración de midazolam sobre la conducta agonística en ratones machos. *Psicothema*. Málaga España; 11: 367-374.

54. McBain, J., Mayer, M. (1994). N-Methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev*, 74: 723–760.
55. Mestanza, G. (2000). Contribución al desarrollo de la Fitoterapia en el Centro de Medicina Complementaria EsSalud La Libertad - Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo.
56. Montgomery, C. (1990). Oncologic and Toxicologic Research: Alleviation and Control of Pain and Distress in Laboratory Animals. *Cancer Bull*; 42: 230-7.
57. Mrlianova, M., Tekel'ová, D., Felklová, M., Reinöhl, V., Tóth, J. (2002). The influence of the harvest cut height on the quality of the herbal drugs *Melissae folium* and *Melissae herba*. *Planta Med*, 68.2: 178–80.
58. Navarro, R., Diamiao, C., Pereira, L. (2011). Efeito da *Matricaria chamomilla* CH12 na resposta de estresse em caes. *Colloquium Agrariae*, 7(2): 01-07.
59. Ngo Bum, E., Gwa, C., Ntchapda, F., Nyunai Nyemb, C., Rakotonirina, S., Rakotonirina, A. (2002). Effect of the decoction of rhizomes of *Cyperus articulatus* on bicuculline, N-methyl-D-aspartate and strychnine-induced behavioural excitation and convulsions in mice. *Journal Cameroon Acad*. 2002; 2: 91-95.
60. Ngo Bum, E., Ngah, E., Benoitte, C., Dong, C., Ayissi Mbomo, R., Rakotonirina, S., et al. (2004). Sedative and anticonvulsant properties of *Pasiflora edulis* dried leaves decoction in mice. *African Journal Traditional*. 1: 63-71.
61. OECD, Guideline for the testing of chemicals N° 143. Acute Toxic Class Method (Adopted 22.03.96).
62. Ohno, K., Sakurai, T. (2008). Orexin neuronal circuitry: role in the regulation of sleep and wakefulness. *Front Neuroendocrinol*, 29:70-87.
63. Ossani G., Pelayes D. Diaz M., Lago N., Fariña S., Monserrat A. et al. (2006). Ocular lesions and experimental choline deficiency. *MEDICINA (Buenos Aires)*; 66: 415-420.
64. Peña, A., Paco, O. (2007). Medicina alternativa: intento de análisis. *Anales de la Facultad de Medicina*. 68(1): 87-96.

65. Pereira, P., Tysca, D., Oliveira, P., Da Silva, B., Picada, J., Ardenghi, P. (2005). Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacol Res*, 52.3: 199–203.
66. Perry, N., Court, G., Bidet, N., Court, J., Perry, E. (1996). European Herbs with cholinergic activities: potential in dementia therapy. *Int J Geriatric Psychiatry*, 11: 1063-1069.
67. Pirzard, A., Alyari, H., Shakiba, M., Zehtab-Salmasi, S., Mohammadi, A. (2006). Essential Oil Content and Composition of German Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) at Different Irrigation Regimes. *Journal of Agromony* 5.3: 451-456.
68. Prados-Atienza, J. (2005). Pensamiento y emoción: el uso científico del término preocupación. *Ansiedad y Estrés*, 11, 37-48.
69. Primer Congreso Internacional FITO (2002). 1ª Edición. “Instituto de Fitoterapia Americano”, Lima-Perú. pp. 31-38
70. Primer Simposio Internacional de Plantas Medicinales y Fitoterapia FITO (2000). “Instituto de Fitoterapia Americano”. 1ª Edición. Lima-Perú. pp. 28-30.
71. Rakotonirina, S., Ngo Bum, E., Rakotonirina, A., Bopelet, M. (2001). Sedatives properties of the decoction of the rhizome of *Cyperus articulatus*. *Fitoterapia*, 72: 22-29.
72. Riker, R., Picard, J., Fraser, G. (1999). Prospective evaluation of the Sedation-Agitation Scale for adult critically ill patients. *Crit Care Med*, 27: 1325-1329.
73. Ríos, Y., Otero, A., Muñoz, D., Echeverry, M., Robledo, S., Yepes, M. (2008). Actividad citotóxica y leishmanicida in vitro del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*). *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* Vol. 37 (2), 200-211.
74. Riveros, M., Hernandez, H., Rivera, J. (2007). Niveles de depresión y ansiedad en estudiantes universitarios de Lima Metropolitana. *Revista de investigación en Psicología*; 10 (1): 91-102.
75. Roberts, A., Williams, J. (1992). The effect of olfactory stimulation on fluency, vividness of imagery and associated mood: a preliminary study. *Br J Med Psychol*, 65.2: 197–9.

76. Rojas, C. (2005). Pensamientos y Sentimientos. Guadalajara – México.
77. Rondón, M. (2006). Salud Mental: Un Problema de Salud Pública en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. Instituto Nacional de Salud Perú; 23 (4): 237-238.
78. Salah, S., Jager, A. (2005). Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J Ethnopharmacol*, 97: 145–9.
79. Salamon I. (1992). Chamomile a medical plant. *The Herb, Spice and medicinal*. 10: 1-4.
80. Sanchez-Medina, A., Etheridge, C., Hawkes, G., Hylands, P., Pendry, B., Hughes, M., et al. (2007). Comparison of rosmarinic acid content in commercial tinctures produced from fresh and dried lemon balm (*Melissa officinalis*). *J. Pharm Pharmaceut Sci*; 10 (4): 455-463.
81. Schmutz, M., Portet, C., Jeker, A., Klebs, K., Vassout, A., Allgeir, H., et al. (1990). The competitive NMDA receptor antagonist CGP 37849 and CGP 39551 are potent, orally active anticonvulsants in rodents. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacol*, 342: 61-66.
82. Sevillano, A. (2003). Enciclopedia de Plantas Medicinales. A.F.A. editores importadores S.A. Tomo I. 1ª Edición. pp. 160-167.
83. Sharapin, N. (2000). Fundamento de Tecnología de productos Fitoterapéuticos. Santa Fe de Bogota. Publicación del programa de Andrés Bello – Programa Iberoamericana de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
84. Shinomiya, K., Inoue, T., Utsu, Y., Tokunaga, S., Masuoka, T., Ohmori, A., et al. (2005). Hypnotic activities of chamomile and passiflora extracts in sleep-disturbed rats. *Biol Pharm Bull*, 28.5: 808–10.
85. Shnitzler, A., Nolan, L., Labbe, R. (1996). Screening of medicinal plants for antileishmanial and antimicrobial activity. *Acta Horti*, 426: 235-242
86. Solinas, V., Deina C., Gessa, A., Bazzoni, M., Loddo D. (1996). Effects of water and nutritional conditions on the *Rosmarinus*

- officinalis* L. phenolic fraction and essential oil yield. *Rivista Italiana Epps*, 19: 189-198.
87. Soulimani, R., Fleurentin, J., Mortier, F., Misslin, R., Derrieu, G., Pelt J. (1991). Neurotropic action of the hydroalcoholic extract of *Melissa officinalis* in the mouse. *Planta Med*; 51: 105-109
88. Soza, A. (2004). Hepatitis tóxica: acetaminofeno y otras. *Gastr Latinoam*; 15 (2):158-162.
89. Thomas, K., Coleman, P. (2004). Use of complementary or alternative medicine in a general population in Great Britain. Results from the National Omnibus Survey. *Journal of Public Health*; 26 (2):152-157.
90. Troncoso, L. (2007). Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) y de una mezcla de vitaminas antioxidantes (A, E, C) en ratas con intoxicación hepática inducida por paracetamol [tesis doctoral] Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
91. Tyrer, P., Baldwin, D. (2006). Generalised anxiety disorder. *Lancet*; 368: 2156–66.
92. Vega, M. (2001). Etnobotánica de la amazonia peruana. Primera Edición. Editorial Abya Yala. Cusco-Perú. pp. 113.
93. Viola, H., Wasowski, C., Levi de Stein, M., Wolfman, C., Silveira, R., Dajas, F., et al. (1995). Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Med*, 61.3: 213–16.
94. Virues, R. (2005). "Estudio sobre Ansiedad" México: Universidad Autónoma de Nuevo León, obtenido el 11 de abril del 2008 en www.psicologiacientifica.com.
95. Vizoso, A., Ramos, A., Villaescusa, A., Decalo, M., Betancourt, J. (1997). Estudio genotóxico in Vitro e in Vivo en tinturas de *Melissa officinalis* L. (Toronjil) y *Mentha piperita* L. (toronjil de Menta). *Rev. Cubana de Plant. Med*; 2 (1): 6-11.
96. Wagner, H., Sprinkmeyer, L. (1973). Ber die pharmakologische Wirkung von Melissengeist. *Dtsch Apoth Ztg*; 113: 1159-1166.
97. Wake, G., Court, J., Pickering, A., Lewis, R., Wilkins, R., Perry, E. (2000). CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal

plants traditionally used to improve failing memory. *J Ethnopharmacol*, 69.2: 105–14.

98. Wolfman, C., Viola, H., Paladini, A., Dajas, F., Medina, J. (1994). Possible anxiolytic effects of chrysin a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*. *Pharmacol. Biochem. Behaviour*, 47: 1-4.
99. Yamada, K., Miura, T., Mimaki, Y., Sashida, Y. (1996). Effect of inhalation of chamomilla oil vapour on plasma ACTH in ovariectomized-rat under restriction stress. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*; 19: 1244-1246.
100. Yamada, K., Miura, T., Mimaki, Y., Sashida, Y. (1996). Effect of inhalation of chamomile oil vapour on plasma ACTH level in ovariectomized-rat under restriction stress. *Biol Pharm Bull*, 19.9: 1244–6.

ANEXO N° 1



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA



MUSEO DE HISTORIA NATURAL

CONSTANCIA N° 069-USM-2009

LA JEFA (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa), recibida del Sr. **JESUS PEDRO BUENDIA OCHOA**, estudiante de la Maestría en Farmacología, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, ha sido estudiada y clasificada como: **Melissa officinalis L.**, y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

GENERO: *Melissa*

ESPECIE: *Melissa officinalis L.*

Nombre vulgar: "Toronjil"

Determinada por: Mg. María I. La Torre A.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de investigación.

Lima, 16 de Noviembre de 2009



Dra. Betty Millán S.
JEFA (e) DEL HERBARIO
SAN MARCOS

DDB

Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Tel/s.: (511) 471-0117, 470-4471,
470-7918, 619-7000 anexo 5704
Fax: (511) 265-6879

e-mail: museohist@unmsm.edu.pe
<http://museohist.unmsm.edu.pe>

ANEXO N° 2



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

MUSEO DE HISTORIA NATURAL



CONSTANCIA N° 068-USM-2009

LA JEFA (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa), recibida del Sr. **JESUS PEDRO BUENDIA OCHOA**, estudiante de la Maestría en Farmacología, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, ha sido estudiada y clasificada como: ***Matricaria reculta* L.**, y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: SCROPHULARIALES

FAMILIA: ASTERACEAE

GENERO: *Matricaria*

ESPECIE: *Matricaria reculta* L.

Nombre vulgar: "Manzanilla"
Determinada por: Mg. Hamilton Beltrán S.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de investigación.

Lima, 13 de Noviembre de 2009



Mg. Betty Millán S.
JEFA (e) DEL HERBARIO
SAN MARCOS

DDE

Av. Arenales 1256, Jesús María
Año. 15-0434, Lima 14, Perú

Teléfono: (511) 471-0117, 470-4471,
470-7010, 610-7600 Anexo 5703
Fax: (511) 265-6819

e-mail: museo@unmsm.edu.pe
<http://museo@unmsm.edu.pe>

ANEXO N° 3

MARCHA FITOQUÍMICA

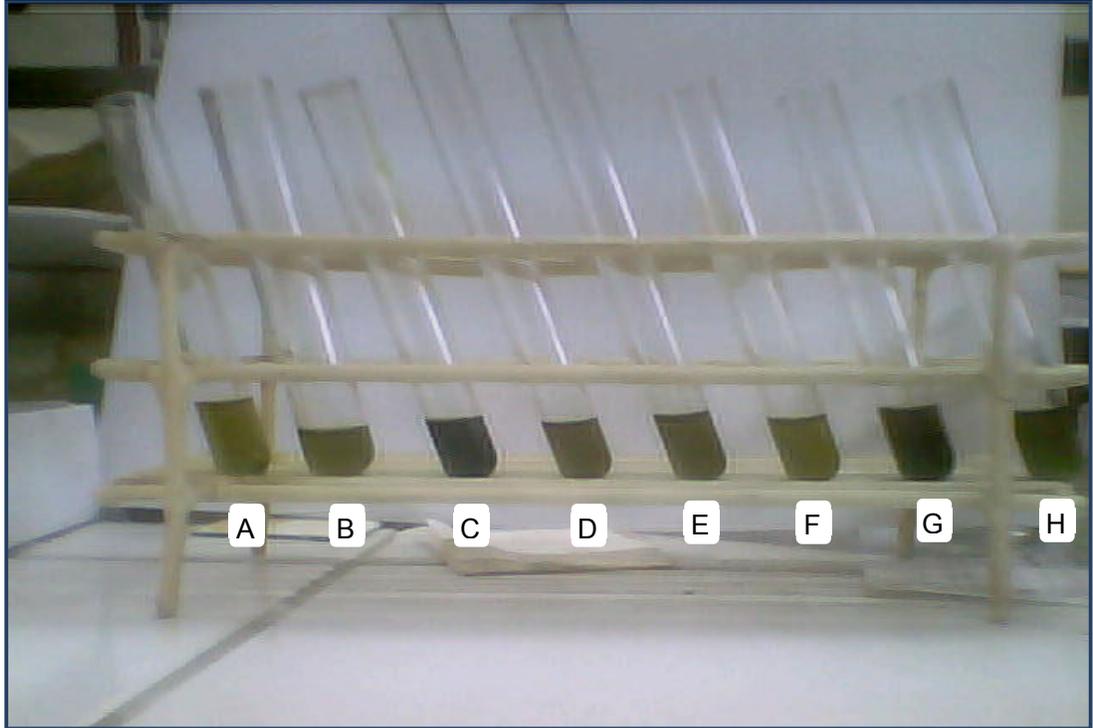
Marcha fitoquímica del extracto alcohólico de *Melissa officinalis*
“Toronjil”



- A) Extracto + Reactivo Ninhidrina.
- B) Extracto + Reactivo Gelatina.
- C) Extracto + Reactivo Tricloruro férrico.
- D) Extracto + Reactivo Dragendorf.
- E) Extracto + Reactivo Molisch.
- F) Extracto + Reactivo NaOH 10%.
- G) Extracto + Reactivo Lieberman.
- H) Extracto + Reactivo Shinoda.

ANEXO N° 4

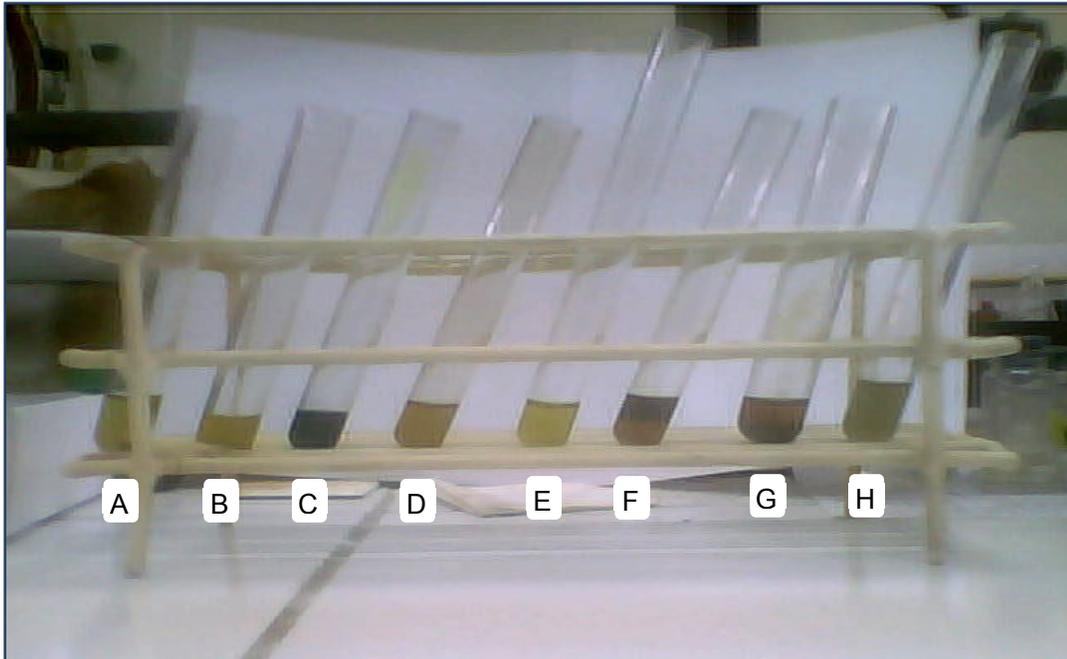
Marcha fitoquímica del extracto alcohólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla”



- A) Extracto + Reactivo Ninhidrina.
- B) Extracto + Reactivo Gelatina.
- C) Extracto + Reactivo Tricloruro férrico.
- D) Extracto + Reactivo Dragendorf.
- E) Extracto + Reactivo Molisch.
- F) Extracto + Reactivo NaOH 10%.
- G) Extracto + Reactivo Lieberman.
- H) Extracto + Reactivo Shinoda.

ANEXO N° 5

Marcha fitoquímica del extracto alcohólico de *Melissa officinalis* "Toronjil" más *Matricaria chamomilla* "Manzanilla"



- A) Extracto + Reactivo Ninhidrina.
- B) Extracto + Reactivo Gelatina.
- C) Extracto + Reactivo Tricloruro férrico.
- D) Extracto + Reactivo Dragendorf.
- E) Extracto + Reactivo Molisch.
- F) Extracto + Reactivo NaOH 10%.
- G) Extracto + Reactivo Lieberman.
- H) Extracto + Reactivo Shinoda.

ANEXO N° 6**Ficha de recolección de investigación N° 1**

Tratamiento	Animales estimulados	% de protección
Sol. Twen 80		
NMDA		
NMDA + DAP7		
EAMM 1 g/Kg		
EAMM 2 g/Kg		
EAMM 4 g/Kg		

Ficha de recolección de investigación N° 2

Tratamiento	Número de animales	Tiempo de dormir
Solución Twen 80		
Diazepam 50 mg/Kg		
Diazepam + EAMM 1 g/Kg		
Diazepam + EAMM 2 g/Kg		
Diazepam + EAMM 4 g/Kg		
Blanco		

Ficha de recolección de investigación N° 3

Semana	Valor promedio de los animales hembras	Valor promedio de los animales machos
Primera semana		
Segunda semana		
Tercera semana		
Cuarta semana		
Quinta semana		
Sexta semana		
Septima semana		

Ficha de recolección de investigación N° 4

Prueba Bioquímica	Valores normales	Valores obtenidos
Urea		
Transaminasas		
Colesterol		
Lipoproteína HDL		

ANEXO N° 7

OPERACIONALIZACION DE LA VARIABLE

Variables	(Variable independiente)	(Variable dependiente)
DEFINICIÓN CONCEPTUAL	Extracto alcohólico de hojas y flores de <i>Melissa officinalis</i> "toronjil" más <i>Matricaria chamomilla</i> "manzanilla"	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ansiedad 2. toxicidad
DEFINICIÓN OPERACIONAL	Preparación del extracto alcohólico, (Sharapin, 2000).	<ol style="list-style-type: none"> 1. Test. de inducción de la ansiedad a través de la prueba de hiperactividad, cambios conductuales por (Ngo Bum et al, 2002) y (Shmutz et al, 1990), test de inducción del sueño en ratones (Beretz et al, 1978) y modificado por (Rakotonirina et al, 2001) 2. Capacidad de causar efectos tóxicos acumulativos o efectos carcinogénicos, mutagénicos o teratogénicos. (Bermúdez et al, 2007).
INDICADORES	Residuo seco	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tiempo de Hiperactividad expresado en minutos; tiempo de dormir. 2. Comparación de cambios en los diferentes órganos con una muestra estándar para evaluar algún daño.
UNIDAD DE MEDICIÓN	g / mL.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tiempo latencia de hiperactividad y tiempo de dormir en minutos 2. Comparación de órganos

ANEXO N° 8

MATRIZ DE CONSISTENCIA

Problema	Objetivo General	Objetivos Específicos	Variables	Técnica de Recolección de Datos	Metodología	Consideraciones Éticas
¿La administración vía oral del extracto alcohólico de <i>Matricaria chamomilla</i> "Manzanilla" más <i>Melissa officinalis</i> "Toronjil" tiene efecto sedante sobre la ansiedad inducida en ratones albinos?	Demostrar el efecto sedante del extracto alcohólico de <i>Melissa officinalis</i> "Toronjil" más <i>Matricaria chamomilla</i> "Manzanilla" sobre la ansiedad inducida en ratones albinos.	<ul style="list-style-type: none"> Realizar el estudio fitoquímico preliminar del extracto alcohólico de <i>Melissa officinalis</i> "Toronjil" más <i>Matricaria chamomilla</i> "Manzanilla". Evaluar el efecto sedante del extracto alcohólico de <i>Melissa officinalis</i> "Toronjil" más <i>Matricaria chamomilla</i> "Manzanilla" sobre la ansiedad inducida en ratones albinos, estableciendo la dosis efectiva 50 ansiolítica. Determinar si la administración del extracto alcohólico de <i>Melissa officinalis</i> "Toronjil" más <i>Matricaria chamomilla</i> 	<p>Variable independiente</p> <p>Extracto alcohólico de hojas y flores de <i>Melissa officinalis</i> "toronjil" más <i>Matricaria chamomilla</i> "manzanilla"</p> <p>Variable dependiente</p> <ol style="list-style-type: none"> Ansiedad toxicidad 	<p>La principal técnica fue la de Observación y el Registro directo de los datos a través de la Ficha de Investigación</p>	<p>Realización del estudio fitoquímico preliminar del extracto alcohólico de <i>Melissa officinalis</i> "Toronjil" más <i>Matricaria chamomilla</i> "Manzanilla". Según Lock de Ugaz, 1988.</p> <p>Evaluación del efecto sedante del extracto alcohólico de <i>Melissa officinalis</i> "Toronjil" más <i>Matricaria chamomilla</i> "Manzanilla" sobre la ansiedad inducida en ratones albinos, estableciendo la dosis efectiva 50 ansiolítica</p> <p>Descrito por Ngo Bum, Shmutz, et al. 1990, Croucher et al, 1982</p> <p>Determinación del efecto sedante comparativo de la administración del extracto alcohólico de <i>Melissa officinalis</i> "Toronjil" más <i>Matricaria chamomilla</i> "Manzanilla" presenta efecto sedante en</p>	<p>En el estudio experimental al utilizar animales de experimentación específicamente ratones y ratas se tuvieron en cuenta las normas y los procedimientos éticos para el manejo de animales de laboratorio establecidos internacionalmente. (Guide for the care and use of laboratory animals, 1996).</p>

Problema	Objetivo General	Objetivos Específicos	Variables	Técnica de Recolección de Datos	Metodología	Consideraciones Éticas
		<p>“Manzanilla” presenta efecto sedante en comparación con el estándar farmacológico en la ansiedad inducida en ratones albinos.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Observar la seguridad del extracto alcohólico de <i>Melissa officinalis</i> “Toronjil” más <i>Matricaria chamomilla</i> “Manzanilla” a nivel hematológico, bioquímico y anatomopatológico al ser administrado por vía oral en ratas normales durante 60 días. 			<p>comparación con estándares farmacológicos en la ansiedad inducida en ratones albinos. Descrito por Beretz et al., 1978, Rakotonirina et al, 2001, Ngobum et al, 2004</p> <p>Observación de la seguridad del extracto alcohólico de <i>Melissa officinalis</i> “Toronjil” más <i>Matricaria chamomilla</i> “Manzanilla” a nivel bioquímico y anatomopatológico al ser administrado por vía oral en ratas normales durante 60 días. Descrito por OECD, 1996</p>	