



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Departamento de Sistemas Biológicos Química
Farmacéutica Biológica



Reporte de Servicio Social en el Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”

Proyecto específico:

Estudio fitoquímico y evaluación farmacológica de *Satureja macrostema* (Lamiaceae) en modelos de conducta en ratones

Alumna: Cinthia Gamboa Sánchez

Matricula: 2182028317

Asesor externo: Dra. Rosa Estrada Reyes

No. de cedula: 4488867

Laboratorio de Fitofarmacología

Dirección de Investigaciones en Neurociencias

Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”

Asesor interno: Dra. Julia Cassani Hernández

No. económico: 29529

Departamento de Sistemas Biológicos

Ciencias Biológicas y de la Salud

Periodo de realización: Del 06 de Marzo al 08 de Septiembre del 2023

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	2
3.	OBJETIVOS	3
3.1	Objetivo general.....	3
3.2	Objetivos específicos	3
4.	HIPÓTESIS	4
5.	ANTECEDENTES.....	5
5.1	<i>S. macrostema</i>	5
5.1.1	Composición química.....	6
5.1.2	Usos etnomédicos	6
5.2	Modelos animales de conducta en roedores	6
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
6.1	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS.....	9
6.1.1	Preparación de extractos	9
6.1.2	Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios.....	9
6.1.2	Análisis espectroscópico de los productos aislados	10
6.2	EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA	10
6.2.1	Animales	10
6.2.2	Administración del tratamiento	11
6.2.3	Pruebas de conducta.....	12
6.2.4	Análisis de datos	14
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
7.1	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	15
7.2	SÓLIDOS OBTENIDOS DEL EXTRACTO DE MeOH DE LA MUESTRA SECA	15
7.3	SÓLIDOS OBTENIDOS DEL EXTRACTO DE AcOET DE LA MUESTRA FRESCA Y ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DEL PRODUCTO AISLADO	18
7.4	PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO EN RATONES.....	22
7.4.1	Evaluación de la actividad motora en la prueba campo abierto	22
7.4.2	Curvas dosis-respuesta de los efectos del EHA y MTZ en la prueba de nado forzado y suspensión de cola	24
8.	CONCLUSIÓN.....	28
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la depresión es un problema de salud pública en todo el mundo. Los tratamientos farmacológicos actuales, aun causan algunos efectos adversos. Sin embargo, la medicina tradicional basada en plantas ha mostrado ser eficaz en el tratamiento de trastornos del estado de ánimo como la depresión esta puede ser una alternativa terapéutica viable (Cassani et al., 2014). Las plantas han sido utilizadas con fines medicinales para diversas afecciones. Estas propiedades curativas son atribuidas a sus metabolitos secundarios, los cuales han mostrado efectos farmacológicos en diversos mamíferos, incluido el ser humano (Penguelly, 1996).

Satureja macrostema Benth. pertenece a la familia Lamiaceae, es una planta arbustiva con olor a menta, mide de 1 a 3 m de alto, tiene tallos erectos, ramas arqueadas, hojas con peciolos y flores que se encuentran solitarias o en grupo de 2 a 3 en las axilas de las hojas (Martínez et al., 2019). *S. macrostema* se utiliza con fines culinarios y medicinales, como aperitivo, carminativo, para combatir las infecciones gastrointestinales (Torres et al., 2018; Carbajal et al., 2023), eliminar la resaca producida por la ingestión alcohólica y alivia un tipo de diarrea denominada "diarrea de tierra caliente" (Carbajal et al., 2023). Existen investigaciones que describen que contienen metabolitos secundarios con efecto antioxidante, hepatoprotector, antimicrobiano, antiinflamatorio y relajante, por mencionar algunos (Pérez, 2012). Sin embargo, no se han encontrado en la literatura disponible datos suficientes sobre su posible actividad antidepresiva. *S. macrostema* es una fuente rica de flavonoides y terpenos, diversos estudios han demostrado que los metabolitos secundarios tales como terpenoides, flavonoides y ácidos fenólicos poseen efecto de tipo antidepresivo en modelos de conducta en roedores (Fedotova et al., 2017).

A la fecha, no hay evidencia científica sobre su eficacia en el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo, tales como la depresión. Este estudio tuvo como objetivo el estudio fitoquímico y la evaluación del efecto de tipo antidepresivo en modelos de conducta en ratones.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En el 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informo que la prevalencia mundial de la depresión aumentó un 25%, este padecimiento es más común en mujeres (7.7%) que en hombres (3.6%).

El tratamiento para la depresión es principalmente farmacológico, sin embargo, su uso a largo plazo puede generar reacciones adversas, tolerancia, dependencia y abuso de su consumo. No obstante la existencia de medicamentos eficaces, uno de los inconvenientes que se presentan es que el inicio de su acción tarda de tres a cuatro semanas y a menudo requiere medicación con ansiolíticos. Debido a lo anterior, existe el interés por estudiar productos naturales para reducir los síntomas de depresión, efectivos y con menos efectos colaterales indeseables (Fedotova et al., 2017; Lamoureux et al., 2021).

S. macrostema es una planta arbustiva aromática perteneciente a la familia Lamiaceae, en estudios químicos se han encontrado la presencia de compuestos de tipo terpenoide tales como: fitol, escualeno, estigmasterol y ácido ursólico, de los cuales se han descrito sus efectos antiinflamatorio y relajante (Bello et al., 2006). Sin embargo, no se han encontrado datos suficientes sobre su actividad antidepresiva.

Por consiguiente, el estudio fitoquímico de *S. macrostema* y la evaluación farmacológica en modelos de conducta en ratones, son fundamentales para determinar su posible efecto antidepresivo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Realizar el estudio químico de las partes aéreas de *S. macrostema* Benth. (Lamiaceae) y su evaluación farmacológica en modelos de conducta en ratones.

3.2 Objetivos específicos

- Obtener extractos de las partes aéreas de *S. macrostema* Benth. (Lamiaceae).
- Evaluar la actividad farmacológica del extracto hidroetanólico de *S. macrostema* Benth. (Lamiaceae) en modelos de conducta en ratones.
- Realizar la separación, aislamiento y purificación de los metabolitos presentes en el extracto de metanol, mediante métodos cromatográficos convencionales.
- Identificar la estructura de los metabolitos secundarios por métodos espectroscópicos como RMN-¹H y ¹³C.

4. HIPÓTESIS

El tratamiento con extracto hidroetanólico de las partes aéreas de *S. macrostema* Benth. (Lamiaceae) a diferentes dosis, causará efectos de tipo antidepresivo a ratones. Sin afectar la actividad ambulatoria espontánea de los ratones.

5. ANTECEDENTES

5.1 *S. macrostema*

Es una planta arbustiva aromática perteneciente a la familia Lamiaceae. Mide 1 a 3 m de alto; tallos erectos, ramas arqueadas y pubescentes; hojas con peciolo de 2 a 5 mm de largo; flores solitarias o en grupos de 2 a 3 en las axilas de las hojas, pedicelos de 2 a 6 mm de largo; cáliz 5-dentado de 7 a 10 mm de largo con la garganta pilosa; corola roja o anaranjada (cambiando a blanquecina o rosada en el secado) de 2 a 3.5 cm de largo; estambres exertos, tecas de las anteras divergentes (**Figura 1**). *S. macrostema* también es nombrada como: *Melissa macrostema*, *Clinopodium macrostemum* Benth. y *Calamintha macrostema* Benth. (Martínez et al., 2019).

En México es una planta endémica que habita en bosques de pino, encino y oyamel, ocasionalmente en matorrales cercanos a los bosques. En el Valle de México se ha encontrado en Cuajimalpa, Tlalpan, Milpa Alta, Tlalmanalco y Amecameca (en altitudes de 2450-3500 m), también se localiza en Jalisco, Veracruz y Oaxaca, a lo largo de la Cordillera Neovolcánica, en bosques de pino, encino y oyamel en altitudes de 2400-3200 m (Martínez et al., 2019; Ortega et al., 2014).



Figura 1. *Satureja macrostema* Benth. (Lamiaceae). (Ortega et al., 2014)

5.1.1 Composición química

Actualmente, en los estudios químicos que se le han realizado a *S. macrostema* se menciona que el principal componente del aceite esencial es la 1-mentona (Carbajal et al., 2023), asimismo es una fuente rica en metabolitos secundarios de tipo flavonoides como las flavanonas, naringenina y hesperidina, a las cuales se les atribuyen efecto antioxidante, y monoterpenos como el linalol, limoneno, canfor, timol, pulegona, p-cimeno, α -terpineol, canfeno, limoneno y el 4-terpinenol, triterpenos como los ácidos oleanólico, ursólico y el 3- hidroxirsuenoico, que han descrito como antimicrobianos y antioxidantes. Se ha encontrado que extractos con limoneno y pulegona inhiben bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (Bello et al., 2006; Torres et al., 2012). Además, terpenoides como el fitol, escualeno, estigmasterol y ácido ursólico han mostrado efectos antiinflamatorio y relajante (Bello et al., 2006).

5.1.2 Usos etnomédicos

En la medicina tradicional de los pueblos Purépecha, *S. macrostema* es utilizada en las bodas porque es considerada como símbolo de fertilidad y para curar el espanto o disminuir los nervios (Loredo et al., 2002). Además, es utilizado como aperitivo, carminativo, para combatir las infecciones gastrointestinales, permite los movimientos gastrointestinales favoreciendo la digestión (Torres et al., 2018; Carbajal et al., 2023). También permite eliminar la resaca producida por la ingestión alcohólica, aliviar la diarrea y como remedio y tónico después de sufrir malaria y fiebres (Carbajal et al., 2023).

5.2 Modelos animales de conducta en roedores

Los modelos animales contribuyen a la explicación de procesos fisiológicos, bioquímicos y conductuales, que se asemejan a los procesos en el ser humano (Mora et al., 2014).

Estos modelos son utilizados para el estudio y prueba de fármacos, ya que permiten evaluar sus efectos farmacológicos en roedores. En estas pruebas a los roedores se les administra el fármaco experimental que modificará la conducta y posteriormente se

evaluarán los parámetros establecidos en cada prueba para permitir identificar los resultados de la aplicación del fármaco (Gómez et al., 2001).

Los modelos animales que simulan aspectos de los trastornos depresivos que son sensibles a los efectos de los antidepresivos de uso en humanos, se basan en la inducción de “desesperanza” donde el animal muestra nulos intentos de lucha y escape para resolver una situación de conflicto. Se tiene así una analogía con la depresión reactiva del humano, en la cual una serie de situaciones cotidianas para las que carece de soluciones lo lleva a una situación de abandono de sí mismo (Song et al., 2021). Entre estos modelos encontramos las pruebas de nado forzado y suspensión de cola, entre otras (Yan et al., 2010).

La prueba de nado forzado fue propuesta por Porsolt (1977), y éste es el modelo más utilizado para evaluar la actividad de tipo antidepresiva. En esta prueba los roedores son forzados a nadar en un cilindro lleno de agua, y del cual no hay posibilidad de escapar, el animal tiene un breve periodo de actividad vigorosa para tratar de escapar, después presenta una postura característica de inmovilidad, que es cuando hace los mínimos movimientos para mantener la nariz por fuera de la superficie del agua e incluso estira las extremidades posteriores, manteniendo el cuerpo en un ángulo entre 30 y 45 grados, asumiendo que el roedor ha encontrado la forma de resolver el conflicto mediante la inmovilidad que es la resignación del roedor por escapar de la situación, el incremento de la inmovilidad se interpreta como una conducta de tipo depresión (Contreras et al., 2003; Cryan et al., 2005). La inmovilidad en esta prueba es considerada un índice de desesperanza y el tratamiento con antidepresivo reduce el tiempo de inmovilidad.

En 1985 fue diseñada la prueba de suspensión de cola, siendo un nuevo procedimiento basado en el modelo de Porsolt para estudiar antidepresivos, en donde el ratón es suspendido por su cola (rabo) y son registrados sus movimientos en un lapso de seis minutos, los cuales serán divididos en períodos de agitación e inmovilidad, siendo que los fármacos antidepresivos permiten que los roedores persistan activamente en conductas dirigidas a escapar durante períodos de tiempo más largos y así disminuyendo el tiempo de inmovilidad. Las principales ventajas de este procedimiento es su sencilla

ejecución y la sensibilidad a una amplia gama de medicamentos (Stéru et al., 1985; Mombereau, et al., 2005).

Por otra parte, la prueba de campo abierto inicialmente descrita por Hall en 1934, ha permitido evaluar el comportamiento locomotor, exploratorio y de ansiedad en roedores, asimismo, es una prueba que permite que el roedor exhiba un amplio rango de conductas (Polanco et al., 2011). La prueba consiste en una caja de vidrio o acrílico con paredes y piso transparente, cuyo piso se divide con líneas pintadas de color negro formando cuadros, en la cual el roedor es colocado en el centro y observado para contabilizar los comportamientos que el animal realiza. Los comportamientos a evaluar son el número de cruzamientos (con las cuatro patas entre las divisiones del campo) siendo considerado como actividad locomotriz, el tiempo de permanencia en el área central de la caja, frecuencia del acicalamiento, estiramientos (reading), micción y de la defecación, entre otras (Rejón et al., 2010).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS

6.1.1 Preparación de extractos

Para la extracción de los compuestos de *S. macrostema*, se utilizó el sistema de maceración en disolvente. Se pesaron 100 g de partes aéreas de la planta seca y molida y 20 g de fresca, fueron maceradas en frascos diferentes y de forma sucesiva en 500 mL de disolvente de polaridad creciente (diclorometano, acetato de etilo y metanol). Por otro lado, 100 g de la muestra seca fueron macerados en una solución de agua y etanol (7:3 v/v). Todos los macerados se agitaron diariamente hasta completar el tiempo de extracción de 10 días a una temperatura de 20-28 °C. Posteriormente, todos los macerados se filtraron por separado y se eliminaron los disolventes por destilación a presión reducida en un rotaevaporador, obteniendo así los extractos de diclorometano, acetato de etilo, metanol e hidroetanólico.

6.1.2 Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios

El extracto de metanol de la muestra seca, se separó en sus componentes mediante cromatografía en columna al vacío (ccv) usando una columna empacada con sílica-gel con un tamaño de partícula de 60 Angstroms (fase estacionaria). Se eluyó inicialmente con hexano, después se aumentó la polaridad con una mezcla de hexano:acetato de etilo (AcOEt) (8:2, 6:4, 4:6, 2:8, 0:10) y AcOEt: metanol (MeOH) (9:10, 0:10). Se recolectaron fracciones de 100 mL cada una, las cuales fueron analizadas mediante cromatografía de capa fina (ccf) en placas de 3x4 cm de sílica gel. Se usaron como reveladores, luz ultravioleta a longitud de 254 y 366 nm en una lámpara UV, revelador universal de $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)/\text{H}_2\text{SO}_4$ y revelador de azúcares compuesto por una mezcla de α -Naftol, etanol, H_2SO_4 y H_2O . De acuerdo con su perfil en ccf las fracciones fueron reunidas.

Los productos de las fracciones se aislaron por precipitación y se recrystalizaron. La precipitación fue con disolvente de polaridad contraria al del disolvente con el que se obtuvo. El disolvente fue adicionado a la fracción o extracto, esta mezcla fue agitada y puesta en reposo durante 10 minutos, posterior a ese periodo de tiempo fue filtrada con un embudo Büchner, tanto el sólido y las aguas madres fueron recolectadas en frascos. El sólido fue pesado en una balanza analítica y analizado mediante ccf junto con las aguas madres obtenidas.

6.1.2 Análisis espectroscópico de los productos aislados

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protón y carbono (^1H y ^{13}C) se determinaron mediante un equipo Bruker Avance de 300 MHz, usando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. El desplazamiento químico (δ) se reportó en unidades por partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz).

6.2 EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

6.2.1 Animales

Para evaluar la actividad farmacológica, se trabajó con ratones macho de la cepa Swiss Webster con un peso de 25-38 g, los cuales fueron proporcionados por el vivario de la Dirección de Investigación en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”. Los animales se mantuvieron a una temperatura de 20-21 °C, humedad relativa de 40-70% y con un ciclo invertido de luz/oscuridad (12:12), la luz se apaga a las ocho de la mañana y se enciende a las ocho de la noche. Los animales de alojaron en cajas de acrílico en grupos de 8-10, todos los animales tuvieron acceso *ad libitum* de agua y alimento. El manejo de los animales fue con base a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999.

6.2.2 Administración del tratamiento

La evaluación del efecto antidepresivo del extracto hidroetanólico de *S. macrostema* (EHA), se llevó a cabo mediante la administración intraperitoneal y oral a dosis de 5, 10, 100, 150 y 200 mg/kg con un tiempo de latencia de 30 minutos antes de iniciar cada prueba. El efecto fue comparado contra un grupo control con vehículo (VEH) (solución salina al 0.9%) y grupos con mirtazapina (MTZ) a dosis de 1.25, 2.5, 5 y 10 mg/kg, en las mismas condiciones que el EHA (**Figura 2**). Posteriormente, se evaluó su efecto antidepresivo sobre la conducta de los animales en los modelos de nado forzado (NF), suspensión de cola (SC) y la actividad ambulatoria en campo abierto (CA). Todas las pruebas se realizaron en la oscuridad, de 10:00 a 13:00 h.

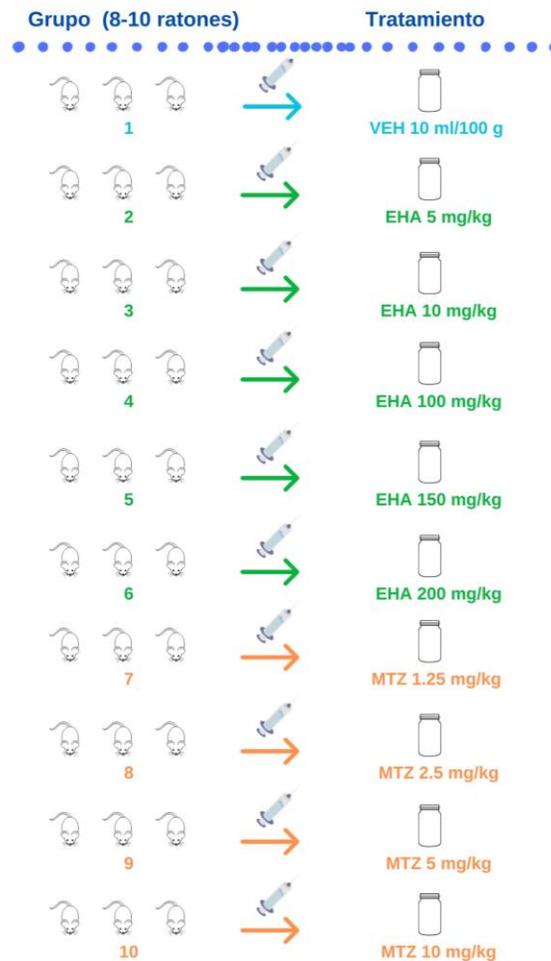


Figura 2. Administración aguda del EHA y MTZ.

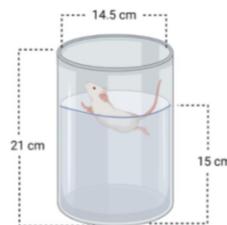
6.2.3 Pruebas de conducta

6.2.3.1 Nado forzado

La prueba se realizó en dos sesiones, la primera sesión de entrenamiento fue una sesión de habituación que dura 15 minutos, en donde cada ratón es colocado dentro de un cilindro de vidrio de 21 cm de alto con un diámetro de 14.5 cm, el cual es llenado con 15 cm de agua a una temperatura de 24 ± 0.5 °C. Pasado del tiempo de entrenamiento se retiraron los ratones del cilindro y fueron secados con toallas de papel para ser regresados a su caja. Después de 24 horas de la sesión de entrenamiento, se realizó la segunda sesión de prueba, donde se volvió a colocar cada ratón en un cilindro por un tiempo de 5 minutos (**Figura 3**).

La duración de la prueba fue grabada con una cámara y los videos que fueron recuperados se utilizaron para realizar la evaluación del tiempo de inmovilidad, el cual solo fue medido durante los últimos 3 minutos e informado en segundos.

Entrenamiento

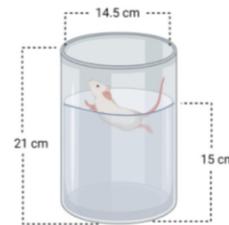


Tiempo de entrenamiento
15 minutos

PRUEBA (Después de 24 horas del entrenamiento)



Tiempo de latencia
30 min



Tiempo de la prueba
5 minutos

Figura 3. Modelo de nado forzado.

6.2.3.2 Suspensión de cola

Este experimento se realizó con un palo de madera de 40 cm, siendo sus extremidades sostenidas con ayuda de un soporte universal en cada lado, a una altura de 50 cm. Cada ratón fue suspendido por su cola colocando cinta adhesiva a 1 cm de la punta de la cola, en una posición tal que no pudieran escapar ni aferrarse a las superficies cercanas (**Figura 4**). La duración de la prueba fue de 6 minutos, pasado el tiempo se retiraron los ratones y fueron regresados a su caja.

Toda la prueba fue grabada con una cámara y los videos fueron recuperados para realizar la evaluación del tiempo de inmovilidad. La conducta se midió en los últimos 4 minutos cuando el ratón permanece colgado pasivamente y completamente inmóvil, este tiempo acumulado fue informado en segundos.

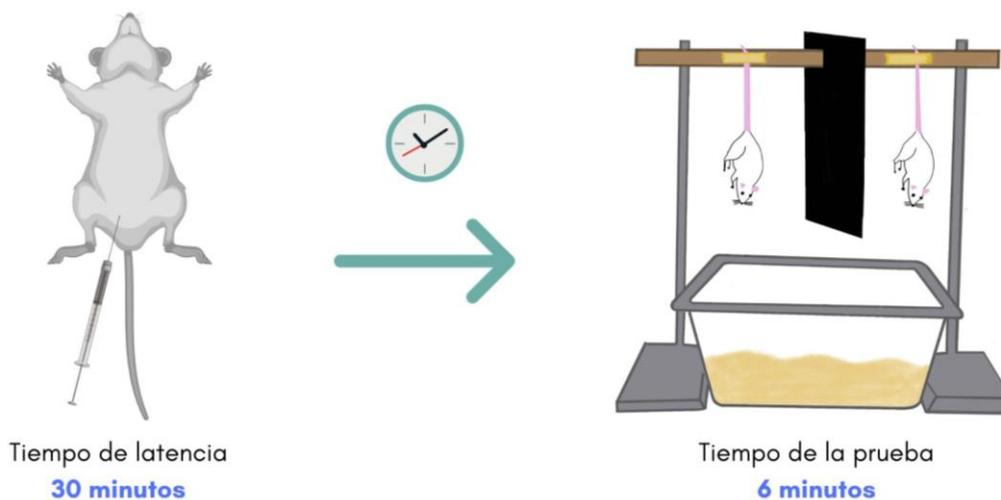


Figura 4. Modelo de suspensión de cola.

6.2.3.3 Campo abierto

Con la prueba de CA se midió la actividad locomotora de los ratones para descartar posibles efectos secundarios indeseables del extracto/fármaco. Se utilizó una caja de acrílico de 53x43 cm y 21 cm de altura, la cual estaba dividida en 6 cuadrantes iguales (**Figura 5**). Cada ratón fue tomado suavemente por la cola e introducido en el centro de la caja. Se registró durante 5 minutos el número de cuentas (número de veces que el

ratón cruzó de un cuadrante a otro) y el número de paradas (número de veces que se paró sobre sus patas traseras). Después del tiempo transcurrido, el ratón fue retirado tomándolo por la cola y devuelto a su caja, el campo fue limpiado con una solución alcohólica al 70% para iniciar la prueba con el próximo ratón.

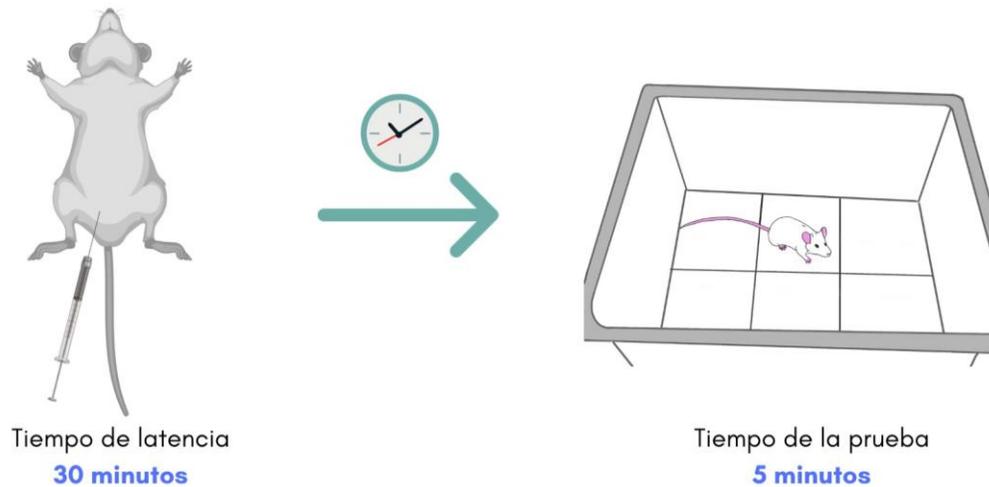


Figura 5. Modelo de campo abierto.

6.2.4 Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el software Sigma Plot 12.0. Se realizó análisis paramétrico de análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para los datos que cumplieron con los criterios de normalidad e igualdad de varianza. Para los datos que no cumplieron con los criterios de normalidad o igualdad de varianza, se utilizó un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis de varianza en rangos. Se consideró significativo un $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

En la **Tabla 1** se muestra el rendimiento de los extractos obtenidos de planta seca y fresca. Los extractos obtenidos a partir de la muestra fresca fueron los que alcanzaron los máximos valores de rendimiento, para el extracto de diclorometano (CH_2Cl_2) fue de 6.5%, AcOEt el 1.25% y MeOH de 14%.

Tabla 1. Rendimiento de los extractos obtenidos de *S. macrostema* seca y fresca.

Planta seca				Planta fresca	
100 g		100 g		20 g	
Disolvente	Rendimiento (mg, %)	Disolvente	Rendimiento (mg, %)	Disolvente	Rendimiento (mg, %)
CH_2Cl_2	2.4, 2.4	$\text{H}_2\text{O} + \text{EtOH}$	21, 21	CH_2Cl_2	1300, 6.5
AcOEt	0.8, 0.8			AcOEt	300, 1.5
MeOH	31.5, 31.5			MeOH	2800, 14

7.2 SÓLIDOS OBTENIDOS DEL EXTRACTO DE MeOH DE LA MUESTRA SECA

Se obtuvo 31.5 g del extracto de MeOH lo que corresponde al 31.5% del rendimiento con respecto al peso de la muestra seca. En total se obtuvieron 86 fracciones en la ccv, la **Tabla 2** muestra la polaridad con las que se obtuvieron y la cantidad del sólido en mg.

Tabla 2. Cantidades de sólidos obtenidos de las fracciones de cromatografía en columna del extracto de MeOH de la planta seca de *S. macrostema*.

Polaridad	Fracción	Rendimiento (mg, %)
Hexano : AcOEt 80 : 20	13	38.6, 0.03
	14	1.3, 0.001
	15	5.2, 0.005
Hexano : AcOEt 20 : 80	60	1.2, 0.001
	61	21.4, 0.02
	62	0.2, 0.0002

AcOEt 100	71-76	17.8, 0.01
MeOH 100	83	1169.3, 1.16
	84	783.3, 0.78
	85	823.3, 0.82
	86	670.1, 0.67

En la **Figura 6** se muestra el perfil en ccf de los componentes de las fracciones eluidas con hexano:AcOEt (80:20; 13,14 y 15), donde se puede observar sin revelación (A) que cada una contienen un compuesto de color negro. La fracción 13 cuenta con 3 compuestos que dos son visibles a la luz UV (B, C). Al igual, la fracción 14 contiene seis compuestos de los cuales tres tienen color amarillo a simple vista. En la fracción 15 se observan mas compuestos al ser expuesta a luz UV (C).

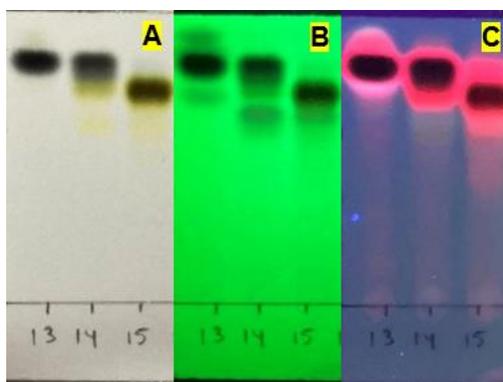


Figura 6. ccf de las fracciones eluidas con hexano:AcOEt (80:20; 13–15). Se utilizó como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil hexano:AcOEt (6:4). Sin revelador (A). Revelador físico: UV 254 nm (B) y UV 366 nm (C).

En la **Figura 7** se observa que las tres fracciones cuentan con los mismos compuestos pero podría ser que al aumentar la polaridad estos tendrían una mejor separación para distinguir sus compuestos, por lo que se decidió no juntarlos.

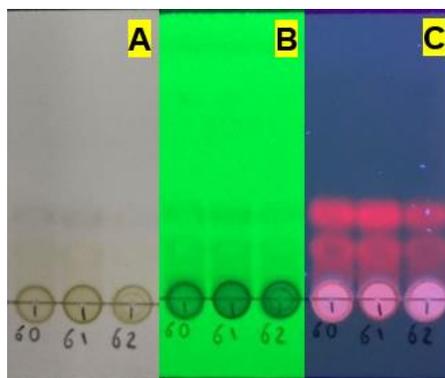


Figura 7. ccf de las fracciones eluidas con hexano:AcOEt (20:80; 60-62). Se utilizó como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil hexano:AcOEt (4:4). Sin revelador (A). Revelador físico: UV 254 nm (B) y UV 366 nm (C).

Las fracción eluidas con AcOEt (100; 71-76) que se muestran en la **Figura 8**, al ser reveladas con luz UV a 254 nm (B) presentaron bandas negras en el mismo rango, así mismo cuando fueron expuestas a luz UV de 366 nm (C) se observaron bandas fosforescentes con la misma longitud. Al ser revelada la placa con revelador universal se confirmó que las seis fracciones eran parecidas, por lo tanto se juntaron estas fracciones para formar solo una.

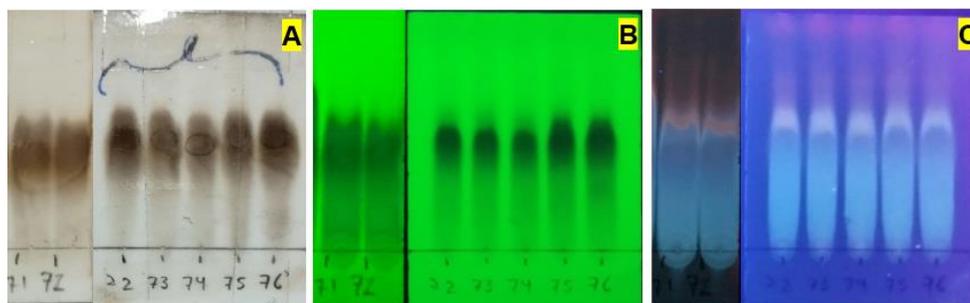


Figura 8. ccf de las fracciones eluidas con AcOEt (100; 71-76). Se utilizó como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil AcOEt:MeOH (8:2). Revelador universal (A). Revelador físico: UV 254 nm (B) y UV 366 nm (C).

En la **Figura 9** se muestra el perfil en ccf donde las primeras cinco aplicaciones representan las soluciones estándar: glucosa (glc), D-glucosa (D-glc), L-ramnosa (L-ram), sacarosa (sac), dextrosa (dex); mientras que las últimas aplicaciones representan las fracciones eluidas con MeOH (100; 82-86).

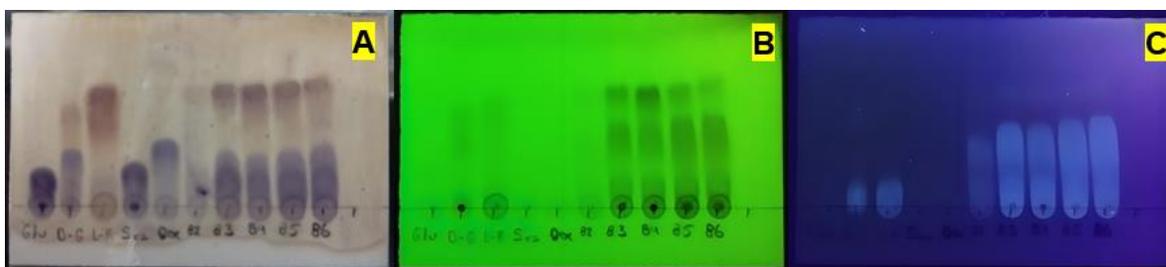


Figura 9. ccf de las fracciones eluidas con MeOH (100; 82-86). Se utilizó como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil AcOEt:MeOH (8:2). Revelador de azúcares (A). Revelador físico: UV 254 nm (B) y UV 366 nm (C).

La placa mostrada en la **Figura 9** fue revelada con un revelador para azúcares (A), al comparar las bandas de las fracciones eluidas con MeOH (100; 82-86). con los estándares de carbohidratos, se observa el mismo color característico de la glc, D-glc, sac y dex por lo que se deduce la presencia de estos azúcares. Así mismo, las bandas de las fracciones eluidas con MeOH (100; 83-86) se encuentran dentro del rango de D-glc y L-ram. Al igual se observan mediante luz UV a longitud de onda de 254 nm (B), bandas negras en las fracciones eluidas con MeOH (100; 83-86) que corresponderían a D-glc y L-ram de acuerdo con las muestras de estándares. La placa expuesta a luz UV a 366 nm (C), evidenció la presencia de bandas fluorescentes que pudieran ser azúcares que no fueron posibles identificar con los estándares evaluados.

7.3 SÓLIDOS OBTENIDOS DEL EXTRACTO DE AcOET DE LA MUESTRA FRESCA Y ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DEL PRODUCTO AISLADO

Del extracto de AcOEt de la muestra fresca se logró precipitar mediante exposición directa con hexano, se obtuvieron 245.8 mg de un sólido que al ser comparado en ccf con una muestra estándar de ácido ursólico se determinó la presencia de este con una mezcla de flavonoides (**Figura 10, A**). Este sólido fue expuesto directamente cuatro veces con AcOEt anhidro hasta lograr que el ácido ursólico total se encontrara en las aguas madres para que el sólido solo tuviera los compuestos de interés (**Figura 10, B**).

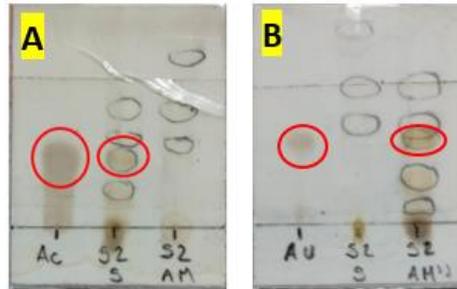


Figura 10. ccf de la comparación del sólido y aguas madres obtenidas con muestra estándar de ácido ursólico. Se utilizó como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil hexano:AcOEt (7:3), revelador universal.

Del sólido obtenido con los compuestos de interés, se obtuvieron 37 mg de un sólido y 34.9 mg de un segundo sólido en las aguas madres, como se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Cantidades de sólidos precipitados obtenidos del extracto de MeOH de la planta fresca de *S. macrostema*

Polaridad	Sólido	Rendimiento (mg, %)
AcOET 100	1	34.9, 0.17
	2	37, 0.18

Al ser analizados por ccf el sólido, se determinó que contaba con compuestos de tipo flavonoides por el color amarillo que presento cuando fue expuesto al revelador universal (**Figura 11, A**), se buscó la polaridad correcta en ccf para separar todos los compuestos (**Figura 11, B**).

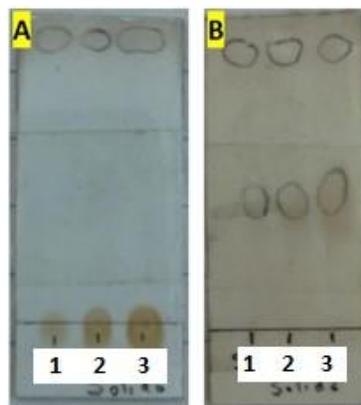


Figura 11. ccf del sólido. Se utilizó como fase estacionaria gel de sílice. Como fase móvil hexano:AcOEt (1:9) (A) y hexano:AcOEt:MeOH (9:1:2) (B), revelador universal en ambos casos. Aplicaciones de la muestra: una (1), seis (2) y doce (3).

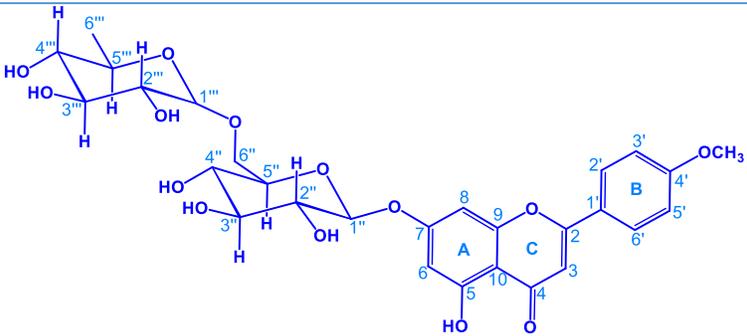
Del sólido obtenido con dos flavonoides se extrajo un compuesto de tipo flavonoide glucosilado identificado como acacetina-7-rutinosido (**Tabla 4, A**), con un punto de fusión de 187-190 °C sin ser corregido. La determinación estructural de este compuesto se hizo principalmente por la comparación de resultados espectroscópicos de RMN reportados por Baoyu (2014) y Park et al. (1995), la elucidación estructural se realizó como se detalla a continuación.

El espectro de RMN-¹H mostró en la región aromática una señal doble de doble del sistema de tipo AA'BB' del anillo B. En 7.47 ppm una señal doble del sistema AA' que corresponden a los protones H-2' y H-6' con una J=8.7 Hz. En 6.98 ppm se observa otra señal doble del sistema BB' asignada a los protones H-3' y H-5' con una J=8.7 Hz. De acuerdo con los anterior el sistema aromático debe contener dos sustituyentes diferentes en posición *para*. Además, la presencia de una señal simple en 6.13 ppm asignado a H-3. La señal doble en 5.61 y 5.60 ppm (J=3 Hz) corresponden respectivamente a los hidrógenos H-8 y H-6 que se posicionan en *meta*. También, se encuentra un grupo metileno (4.99 ppm, Ha y 4.96 ppm, Hb), con una J=9 Hz, este grupo se asignó en la posición 6'' del compuesto. Los datos de los glucósidos no fueron posibles de obtener debido al solapamientos de múltiples señales que se encuentran entre 4.5 y 2.5 ppm, sin embargo, se observa una señal doble en 1.09 ppm que corresponde a los hidrógenos del metilo de la ramnosa (H-6'''). La presencia de una señal simple en 3.76 ppm es asignado a OMe-4'.

En el espectro de RMN-¹³C se pueden apreciar la señal del carbono correspondiente al carbonilo en 197.50 ppm. Las señales simples en zona aromática que se observan entre 164.00 a 95.00 ppm corresponden a los carbonos de los anillos A y C. También, las señales que se encuentran en 128.90 y 115.62 ppm corresponden al sistema del tipo AA'BB' del anillo B, asignados respectivamente a C-2' y C-6' y a C-3' y C-5'. Así mismo, las señales simples de los sacáridos se observan entre 104.00 a 67.00 ppm. Las señales en 66.43, 55.6 y 18.25 ppm son asignados respectivamente a los carbonos de C-6'', OMe-4' y C-6'''.

En la **Tabla 4** se presentan los datos espectroscópicos de acacetina-7-rutinosido y su estructura.

Tabla 4. Estructura y datos espectroscópicos de acetina-7-rutinosido.

Acetina-7-rutinosido			
 <p style="text-align: center;">(A)</p>			
RMN-¹H (300 MHz)			
Asignación	δ ¹ H (ppm)	J (Hz)	
OH-5	12.00	s	
H-2'/H-6'	7.47	d, J= 8.7	
H-3'/H-5'	6.98	d, J= 8.7	
H-8	5.61	d, J= 3	
H-6	5.56	d, J= 3	
H-6''a	4.99	d, J= 9	
H-6''b	4.96	d, J= 9	
OMe-4'	3.76	s	
H-6'''	1.09	d	
RMN-¹³C (300 MHz)			
Posición C	δ ¹³ C (ppm)	Posición C	δ ¹³ C (ppm)
4	197.50	8	95.90
2	163.44	5''	76.69
7	163.08	3''	76.00
4'	163.00	2''	73.40
9	159.94	2'''	71.12
5	158.22	3'''	70.71
2'/6'	128.90	4''	70.06
3'/5'	115.62	4'''	68.74
1'''	103.73	6''	66.43
6	101.02	OMe-4'	55.61
3	99.83	6'''	18.25
1''	96.91		

7.4 PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO EN RATONES

7.4.1 Evaluación de la actividad motora en la prueba campo abierto

Para descartar efectos secundarios de EHA, se evaluó la actividad motora de los ratones mediante la prueba de campo abierto. En la **Tabla 5, A** se muestran los resultados de la actividad motora que presentaron los ratones tratados con MTZ y VEH, se observa que a dosis de 5 y 10 mg/kg disminuye significativamente tanto el número de cuentas ($F_{(4, 26)}=65.37, p \leq 0.001$) como el de paradas ($H=23.08, gl=4, p \leq 0.001$) con respecto al grupo tratado con VEH. Asimismo, se observó que a las dosis de 1.25 y 2.5 mg/kg tienen un número muy parecido de cuentas y de paradas a las del VEH. La afectación en la actividad motora de los ratones se debe a que MTZ tiene una alta afinidad por los receptores histaminérgicos H-1 siendo estos los responsables del efecto sedante (Anttila et al., 2001). Con estos resultados es posible observar el efecto sedante en ratones y así poder descartar este efecto en ratones tratados con EHA.

En la **Tabla 5, B** se presentan los resultados de los ratones que fueron administrados con EHA vía intraperitoneal, se observa que EHA modificó significativamente el número de cuentas ($H=18.88, gl=3, p \leq 0.001$) y el número de paradas ($H=21.28, gl=3, p \leq 0.001$) en comparación con el grupo tratado con VEH, confirmando que EHA administrado vía intraperitoneal causa efecto sedante que altera su actividad motora, razón por la cual se repitió la prueba, modificando únicamente la vía de administración por la oral con el objetivo de evaluar la posible reducción del efecto sedante. Los resultados de la administración oral de EHA se muestran en la **Tabla 5, C**, solamente se aprecia solo hay diferencias significativas en el número de paradas a la dosis de 5 mg/kg ($F_{(2, 22)}=9.05, p=0.002$) con respecto al VEH, de igual manera se observó que a las dosis de 150 y 200 mg/kg existen una reducción significativa en el número de cuentas en comparación con el grupo tratado con VEH ($F_{(3, 27)}=7.66, p \leq 0.001$).

Tabla 5. Actividad motora de los ratones para descartar posibles efectos secundarios indeseables de mirtazapina y del extracto hidroetanólico (EHA) en la prueba de campo abierto.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Núm. de cuentas Mean ± SEM	Núm. de paradas Mean ± SEM
Vía intraperitoneal			
A) MTZ	VEH	47.85 ± 2.53	16.42 ± 1.99
	1.25	38.42 ± 2.76	17.00 ± 2.93
	2.5	42.00 ± 3.45	20.57 ± 5.23
	5	17.28 ± 1.44 ***	4.57 ± 0.78 ***
	10	2.14 ± 0.26 ***	0.14 ± 0.14 ***
		$F_{(4, 26)}=65.37, p \leq 0.001$	$H=23.08, gl=4, p \leq 0.001$
B) EHA	VEH	47.14 ± 2.28	21.14 ± 2.58
	100	5.85 ± 2.52 ***	0.00 ± 0.00 ***
	150	3.57 ± 0.71 ***	0.42 ± 0.42 ***
	200	1.71 ± 0.28 ***	0.28 ± 0.18 ***
		$H=18.88, gl=3, p \leq 0.001$	$H=21.28, gl=3, p \leq 0.001$
Vía oral			
C) EHA	VEH	48.12 ± 2.20	21.00 ± 2.24
	5	45.25 ± 3.02	37.87 ± 3.67 ***
	10	39.71 ± 3.27	33.85 ± 2.78
		$F_{(2, 22)}=2.18, p=0.138$	$F_{(2, 22)}=9.05, p=0.002$
	VEH	54.28 ± 1.58	16.42 ± 1.99
	100	54.28 ± 3.30	25.71 ± 3.06
	150	40.42 ± 5.50 *	24.00 ± 5.88
	200	31.71 ± 4.53 **	18.42 ± 6.06
		$F_{(3, 27)}=7.66, p \leq 0.001$	$F_{(3, 27)}=0.92, p=0.445$

Las comparaciones se hicieron utilizando ANOVA para los datos que cumplieron con los criterios de normalidad e igualdad de varianza y para los datos que no cumplieron con los criterios de normalidad o igualdad de varianza, se utilizó un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis de varianza en rangos: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$, significativamente diferente del VEH.

Actualmente, se ha descrito que algunos glucósidos de flavonoides pueden interactuar con el sistema GABAérgico, varias flavonas son capaces de unirse al sitio de las benzodiazepinas en el receptor GABA-A lo que produce el efecto sedante tanto en roedores como en humanos (Jäger et al., 2011). Teniendo en cuenta que EHA tiene derivados de flavonoides como acacetina-7-rutinosido, se puede suponer que este compuesto es partícipe en la inducción de la sedación de los ratones en la prueba de campo abierto. Además, es reconocido que la vía de administración es un factor que

puede modificar la respuesta de un compuesto, por ejemplo, la vía peritoneal permite una mayor biodisponibilidad, en comparación con la vía oral en la cual muchas veces el compuesto sufre el efecto de primer paso o biotransformación en el hígado determinando una menor biodisponibilidad (Shoyaib et al., 2019). También es importante mencionar que el metabolismo de los flavonoides que se encuentran generalmente como β -glucósidos y que antes de ser absorbidos como aglicona en la circulación sistémica deben sufrir una desglucosilación, una vez hidrolizados se conjugan por metilación, sulfatación o glucuronidación lo que hace que por general su concentración en el plasma sea baja debido a su capacidad de conjugación alta (Jäger et al., 2011; Estrada et al. 2012). Con lo anterior descrito, se demuestra que con los resultados que se obtuvieron en la administración oral del EHA hubo una reducción del contenido de los flavonoides glucosilados que podrían explicar la disminución del efecto sedante en los ratones.

7.4.2 Curvas dosis-respuesta de los efectos del EHA y MTZ en la prueba de nado forzado y suspensión de cola

En la **Figura 12, A** se muestra el efecto de diferentes dosis administradas de MTZ y del VEH sobre la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado. Se observa una disminución de la inmovilidad en las dosis de 1.25, 2.5, 5 y 10 mg/kg con respecto al grupo tratado con VEH ($F_{(4, 30)}=51.15, p \leq 0.001$). Estos resultados permitieron establecer las condiciones adecuadas del modelo para determinar la actividad de tipo antidepresiva del EHA.

La **Figura 12, B, C y D** presentan la actividad antidepresiva del EHA y del VEH. La **Figura 12, B** indica que la administración por vía intraperitoneal de las dosis de 100 y 150 mg/kg no produjeron cambios significativos en la conducta de inmovilidad con respecto al VEH, observándose únicamente una reducción en la inmovilidad a la dosis de 200 mg/kg ($F_{(3, 31)}=10.917, p \leq 0.001$), los datos evidenciaron que EHA podría presentar efecto antidepresivo siendo esta una razón para volver a realizar la prueba con un cambio de la vía de administración por la oral. Los resultados obtenidos de la administración por vía oral se muestran en la **Figura 12, D**, donde se aprecian cambios significativos en el

tiempo de inmovilidad con respecto al VEH a las dosis de 100, 150 y 200 mg/kg ($F_{(3, 27)}=28.33$, $p \leq 0.001$), lo cual confirma que EHA cuenta con un efecto antidepresivo. Asimismo, en la **Figura 12, C** se observa que a dosis bajas de 5 y 10 mg/kg, solo existe una disminución significativa respecto al control a dosis de 5 mg/kg ($F_{(2, 20)}=3.984$, $p=0.037$).

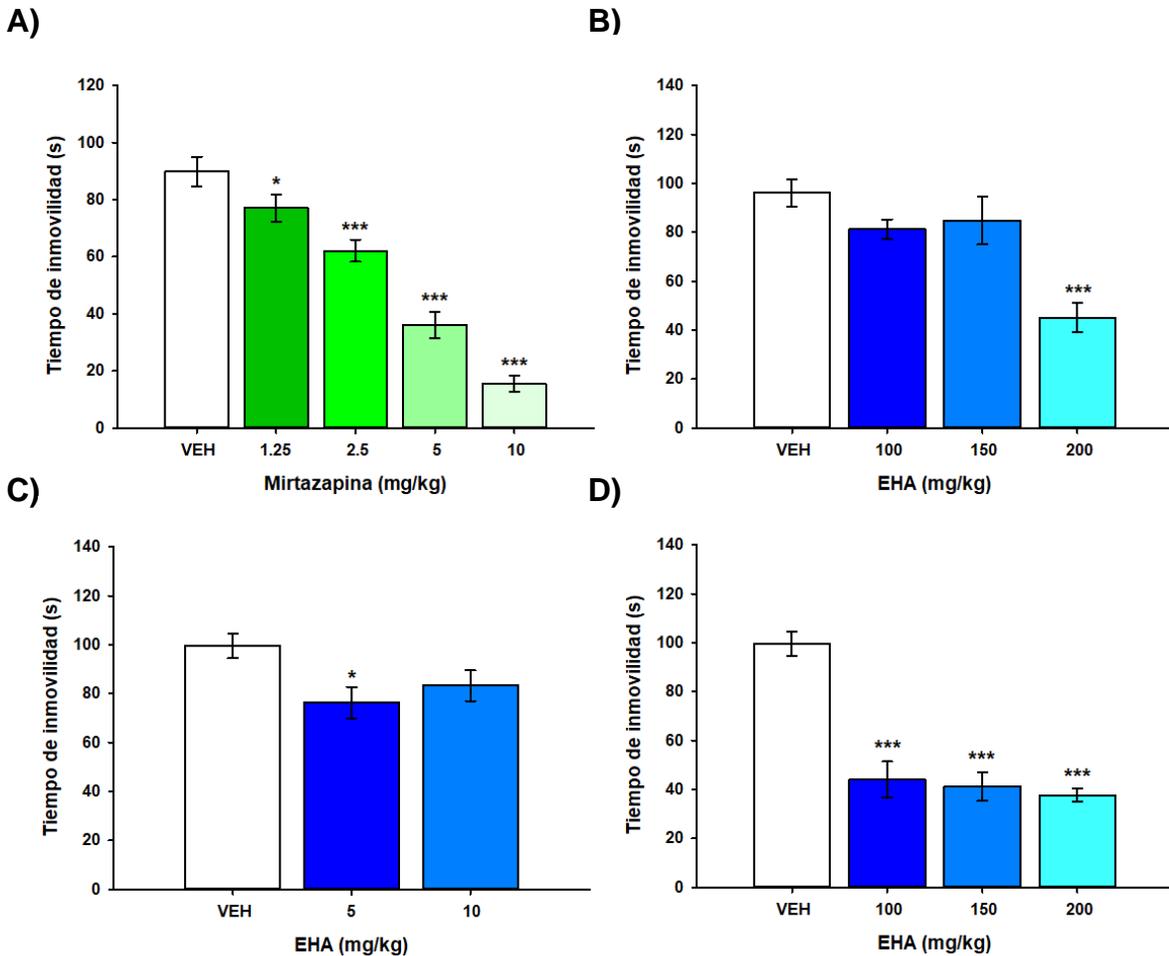


Figura 12. Efectos de mirtazapina y del extracto hidroetanólico (EHA) sobre el efecto de tipo antidepresivo en la prueba de nado forzado en ratones. Vía de administración: Intraperitoneal (A, B); Oral (C, D). Los resultados se expresan como la media \pm SEM del tiempo de inmovilidad a los tres minutos en la prueba de nado forzado. Las comparaciones se hicieron utilizando ANOVA: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$, significativamente diferente del VEH.

Los resultados del efecto de tipo antidepresivo en la prueba de suspensión de cola se presentan en la **Figura 13**. Se muestra en la **Figura 13, A** el efecto de las distintas dosis de MTZ y el VEH sobre la conducta de inmovilidad en la prueba de suspensión de cola,

se puede apreciar que hubo una reducción significativa del tiempo de inmovilidad en las dosis de 5 y 10 mg/kg con respecto al grupo administrado con VEH ($F_{(4, 34)}=17.81, p \leq 0.001$), mientras que en las dosis de 1.25 y 2.5 mg/kg no se mostraron cambios significativos sobre la conducta de inmovilidad.

Las **Figuras 13, B, C y D** reflejan la actividad de tipo antidepresiva del EHA y del VEH. Se observa en la **Figura 13, B** que la administración por vía intraperitoneal de las dosis de 100 mg/kg no produjeron cambios significativos en la conducta de inmovilidad con respecto al VEH, únicamente hay una reducción en la inmovilidad a las dosis de 150 y 200 mg/kg ($F_{(3, 27)}=42.56, p \leq 0.001$) lo cual revela que podría presentar efecto antidepresivo el EHA; tomando esto en cuenta se prosiguió a realizar la prueba nuevamente modificando la vía de administración intraperitoneal por la administración oral. Los resultados obtenidos de la administración oral se muestran en la **Figura 13, D**, se aprecian cambios significativos en el tiempo de inmovilidad con respecto al VEH a las dosis de 100, 150 y 200 mg/kg ($F_{(3, 27)}=50.46, p \leq 0.001$), lo cual confirma que EHA cuenta con un efecto antidepresivo. Finalmente, en la **Figura 13, C** se observa que a dosis bajas de 5 y 10 mg/kg, solo existe una disminución significativa respecto al control a dosis de 5 mg/kg ($F_{(2, 23)}=34.97, p \leq 0.001$).

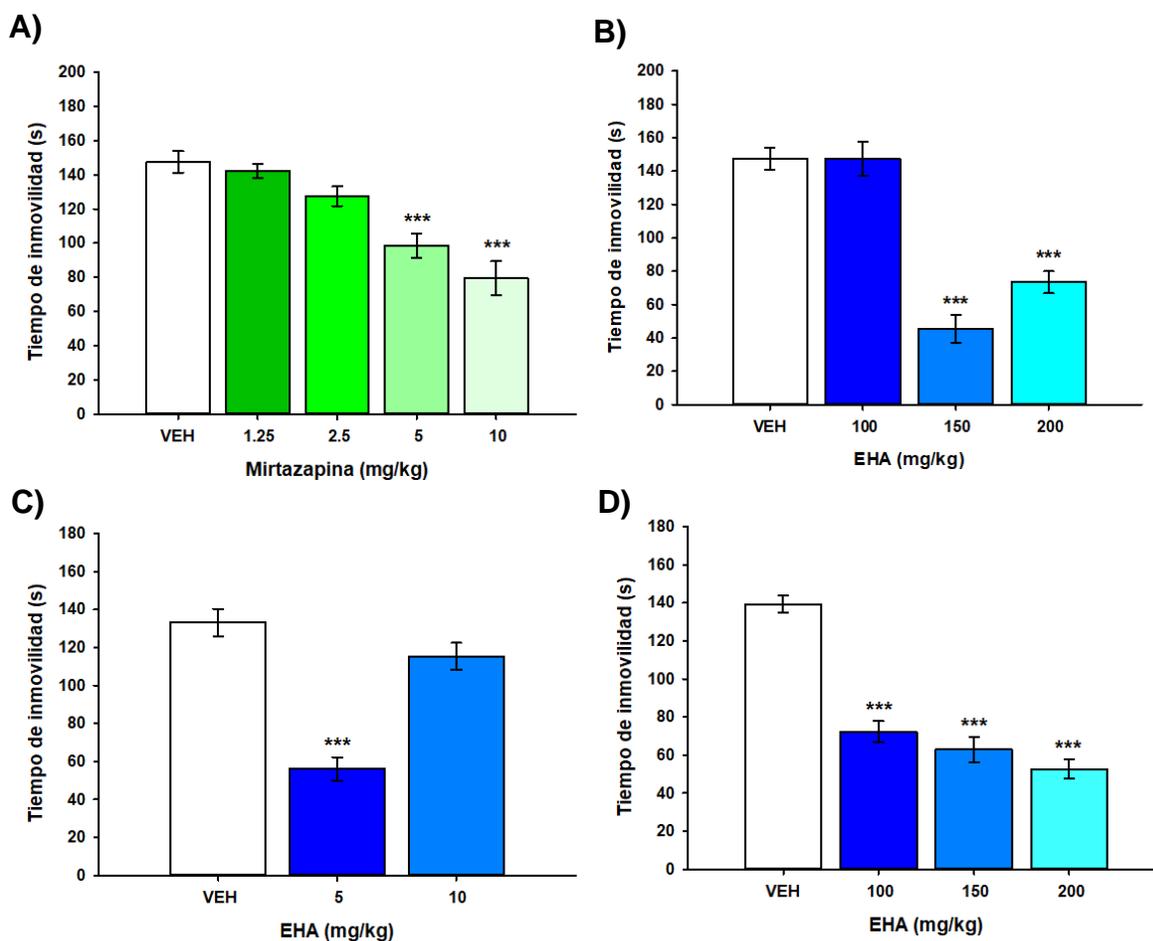


Figura 13. Efectos de mirtazapina y del extracto hidroetanólico (EHA) sobre el efecto de tipo antidepresivo en la prueba de suspensión de cola en ratones. Vía de administración: Intraperitoneal (A, B); Oral (C, D). Los resultados se expresan como la media \pm SEM del tiempo de inmovilidad a los cuatro minutos en la prueba de suspensión de cola. Las comparaciones se hicieron utilizando ANOVA: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$, significativamente diferente del VEH.

8. CONCLUSIÓN

El estudio fitoquímico de las partes aéreas de *S. macrostema*, permitió el aislamiento de trece compuestos de los cuales: ocho compuestos no fueron posibles de identificar, cuatro compuestos en su perfil en ccf mostraron ser mezcla de azúcares como glucosa, D-glucosa, L-ramnosa, sacarosa y dextrosa. Se logró purificar e identificar la acacetina-7-rutinosido, la determinación de su estructura se determinó mediante la interpretación de sus características en RMN ^1H ^{13}C y por comparación con los datos reportados en la literatura.

Se encontró que el extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *S. macrostema* administrado por vía intraperitoneal causó efecto sedante que afectó la actividad motora de los ratones; mientras que administrado por vía oral permitió reducir este efecto sedante. Asimismo, demostró tener efecto antidepresivo en ratones en ambos modelos de depresión, la prueba de suspensión de cola y de nado forzado.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anttila, S. y Leinonen, E. (2001). A review of the pharmacological and clinical profile of Mirtazapine. *Cns Drug Reviews*, 7(3), 249-264. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2001.tb00198.x>
- Baoyu, H., y Chen, J. (2014). Acacetin-7-rutinoside from *Buddleja Lindleyana*, a new molluscicidal agent against *Oncomelania Hupensis*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. <https://doi.org/10.5560/znc.2013-0179>
- Bello, G. M. A., Molina, T. J., Calderón, M. J., García, Ch. A. y Salgado, G. R. (2006). Propiedades antimicrobianas y análisis fitoquímico de seis plantas medicinales de la comunidad indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, 97 Michoacán, México. 2º Congreso de Investigación Científica. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.
- Carbajal Tolentino, J. E., Salmerón, B. G., Gama Gálvez, M. D. L. N., & Galindo Ramos, G. (2023). Actividad antioxidante y antimicrobiana del Nurite (Satureja *Macrostema* (Benth), Briq). *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(1), 425-444. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i1.4402
- Cassani, J., Dorantes, A. M., Novales, L. M., Real, G. A. y Estrada, R. (2014). Anti-Depressant-Like effect of Kaempferitrin isolated from *Justicia spicigera* schldl (Acanthaceae) in two behavior models in mice: evidence for the involvement of the serotonergic system. *Molecules*, 19 (12), 21442-21461. <https://doi.org/10.3390/molecules191221442>
- Contreras, C. M., Rodríguez, J. F., Gutiérrez, A. G., y Bernal, B. (2003). El estudio experimental de la ansiedad y la depresión. *Ciencia*, 54(2), 29-39. https://revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/54_2/estudio_experimental.pdf

- Cryan, J. F., Mombereau, C., y Vassout, A. (2005). The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 571-625. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.009>
- Cryan, J. F., Valentino, R. J., y Lucki, I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 547-569. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.008>
- Estrada, R., Ubaldo, D. y Araujo, A. G. (2012). Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud mental*, 35(5), 375-384. Recuperado en 10 de diciembre de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33252012000500004&lng=es&tlng=es
- Fedotova, J., Kubatka, P., Büsselberg, D., Shleikin, A., Caprnda, M., Dragasek, J., Rodrigo, L., Pohanka, M., Gasparova, I., Nosál, V., Opatrilova, R., Qaradakh, T., Zulli, A. y Kruzliak, P. (2017). Therapeutical strategies for anxiety and anxiety-like disorders using plant-derived natural compounds and plant extracts. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 437 - 446. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.107>
- Gómez, C., Saldívar, J. A. y Rodríguez, R. (2001). Modelos animales para el estudio de la ansiedad: Una aproximación crítica. *Salud Mental*, 25(1), 14-24. https://www.medigraphic.com/pdfs/salmen/sam_2002/sam021d.pdf
- Jäger, A., y Saaby, L. (2011). Flavonoids and the CNS. *Molecules*, 16(2), 1471-1485. <https://doi.org/10.3390/molecules16021471>
- Lamoureux, C., Berbiche, D., y Vasiliadis, H. (2021). Treatment adequacy and remission of depression and anxiety disorders and quality of life in primary care older adults.

Health and Quality of Life Outcomes, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12955-021-01851-4>

Loredo, O. L., Rodríguez, J. M. y Ramos M. G. (2002). Aprovechamiento de recursos vegetales en una localidad de la Reserva de la Biósfera Mariposa Monarca, Michoacán, México. *Etnobiología*, 2(1), 32-60.

Martínez, M., Martínez, E., García, M. R., Cantú, E.A. y Fragoso, I. (2019). Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Lamiaceae Martinov. <https://doi.org/10.22201/ib.9786073018005e.2019>

Mora, A. y Castillo, S. (2014). Modelos animales de miedo y ansiedad: Descripciones neuro-conductuales. *Actualidades en Psicología*, 28(117), 1–12. <https://doi.org/10.15517/ap.v28i117.14595>

Ortega, T., y Vázquez, V. (2014). *Satureja macrostema*: Situación ambiental, conocimiento local y roles de género. *Madera Y Bosques*, 20(2), 71-86. <https://doi.org/10.21829/myb.2014.202165>

Park, J. C., Lee, J. H., & Choi, J. S. (1995). A flavone diglycoside from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*. *Phytochemistry*, 39(1), 261-262. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00897-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00897-3)

Pengelly, A., (1996). The constituents of medicinal plants: an introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine. Crows Nest, N.S.W: Allen & Unwin

Pérez, R. M. (2012). Antihepatotoxic, nephroprotective, and antioxidant activities of phenolic compounds from *Satureja macrostema* leaves against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in mice. *Medicinal Chemistry Research*, 22(4), 1846-1855. <https://doi.org/10.1007/s00044-012-0176-x>

- Polanco, L. A., Vargas, C., y Góngora, M. E. (2011). Modelos animales: Una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad. *Suma Psicológica*, 18(2), 141-148. <https://doi.org/10.14349/sumapsi2011.987>
- Porsolt, R. D., Pichon, M. L., y Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604), 730-732. <https://doi.org/10.1038/266730a0>
- Rejón, J. C, Perdomo, D., y Roldán, G. (2010). Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas. *Universitas Medica*, 52(1), 78-89. <https://doi.org/10.11144/javeriana.umed52-1.pcrp>
- Shoyaib, A. A., Archie, S. R. y Karamyan, V. T. (2019). Intraperitoneal route of drug administration: Should it be used in experimental animal studies? *Pharmaceutical Research*, 37(1). <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2745-x>
- Song, J. S., y Kim, Y. (2021). Animal models for the study of depressive disorder. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 27(6), 633-642. <https://doi.org/10.1111/cns.13622>
- Stéru, L., Chermat, R., Thierry, B., y Simon, P. (1985). The tail suspension Test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3), 367-370. <https://doi.org/10.1007/bf00428203>
- Tolentino, J. E., Salmerón, B., Gama, M. y Ramos, G. (2023). Actividad antioxidante y antimicrobiana del nurite (*Satureja macrostema* (Benth), Briq). *Ciencia latina*, 7(1), 425-444. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i1.4402
- Torres, R., Bello, M. Á., Molina, J., Ramírez, E., García, Y., Fulgencio, R., García, A., López, R., Martínez, M. M., Lara, B. N. y Salgado, R. (2013). Efecto de la fertilización sobre el crecimiento y contenido de compuestos volátiles en *Satureja*

macrostema (Benth) Briq. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 5 (21), 122-134. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322014000100009&lng=es&tlng=es.

Torres, R., García, Y. M., Ríos, P., Saavedra, A., López, J. E., Ochoa, A. y Salgado, R. (2018). Antioxidant activity of the essential oil and its major terpenes of *Satureja macrostema* (MOc. and Sessé ex Benth.) Briq. *PubMed*, 13(Suppl 4), S875-S880. https://doi.org/10.4103/pm.pm_316_17

Yan, H., Cao, X., Das, M., Zhu, X., y Gao, T. (2010). Behavioral animal models of depression. *Neuroscience Bulletin*, 26(4), 327-337. <https://doi.org/10.1007/s12264-010-0323>