



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”



ACTIVIDAD SEDANTE Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS
EXTRACTOS DE *Ternstroemia delicatula*

www.bdigital.ula.ve

Autor (as):

Castillo R. Leslie G.
Gutiérrez A. Rosana Y.

Tutor:

Prof. Alida Pérez

Co-tutor:

Prof. Ysbelia Obregón

Mérida, Marzo de 2021

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos primeramente a **Dios**, por ser el inspirador y darnos fuerzas para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados. Por guiarnos y cuidarnos en cada decisión a lo largo de nuestra carrera.

A la memoria del **Prof. Luis Rojas** por creer y apostar en nuestro proyecto desde el inicio de la investigación. Siempre lo recordaremos.

A nuestra tutora **Prof. Alida Pérez** y cotutora **Prof. Ysbelia Obregón** por confiar en nosotras durante el desarrollo de nuestra investigación.

A la **Prof. Yasmin Morales** por su gran disposición y aportes indispensables en la culminación de este trabajo.

Al Instituto de Investigaciones “**Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro**” en especial a la **Dra. Rosa Aparicio** por su gran colaboración.

A la **Dra. Yepsis Montero** y **Prof. Belkys Quiñones** por su colaboración y abrir las puertas del Bioterio Central de la Universidad de Los Andes para el desarrollo experimental de nuestra investigación.

Al **Dr. José Ramón Grande** por el aporte durante el inicio de este proyecto.

A los **amigos** que nos deja la vida universitaria, por compartir conocimientos y experiencias con nosotras. Y a los que hoy se encuentran a distancia gracias por el apoyo y animarnos cada día.

A la **Ilustre Universidad de Los Andes** y a cada uno de los profesores a quienes tuvimos la oportunidad de conocer, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de nuestra preparación profesional.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico primeramente a **mis padres**, Sandra y Reinaldo por ser los pilares fundamentales de mi familia, gracias por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, siendo un apoyo incondicional en mi desarrollo personal y académico.

A **mis hermanos**, Reinaldo y Rosmary por ser partícipes de esta meta, brindándome su cariño y apoyo en todo momento. Los extraño.

A **la memoria** de mi Abuela Esperanza, porque desde el cielo sé que sigues guiándome en cada uno de mis pasos.

A **mi Abuela (Lic. Rosa Duque)** por ser mi gran ejemplo profesional. Gracias por el amor y las oraciones que me acompañaron siempre.

A **mis sobrinos**, Reinaldo, Victoria, Mathias y Diego por regalarme su inocencia y amor. Espero que vean en mí un ejemplo a seguir.

A **Amanda**, por ser mi confidente y mi pañuelo de lágrimas a lo largo de mi carrera, por ser quien de una u otra manera me animó a seguir adelante y que hoy pueda ver materializado este sueño.

A **mi Tía Janett**, porque aún en la distancia siempre tiene los mejores consejos para seguir adelante. Gracias por el apoyo incondicional.

A **las amigas que me regaló la Universidad**, Kelly, Katherin y Rocerly por creer en mí, por los momentos vividos y porque esta meta significa un escalón menos para reencontrarnos. Nos vemos pronto.

Leslie Castillo Rojas

DEDICATORIA

Primeramente, le dedico mi investigación a **mis padres**, Carlos y Diana, que con su amor hicieron de mí la persona que soy hoy en día, por su dedicación, esfuerzo y apoyo incondicional a lo largo de todos estos años, este logro también es de ustedes.
LOS AMO

A **mis hermanas**, Karla y Dianela, que siempre con sus palabras y apoyo me ayudan a continuar, a pesar de la distancia siempre están en el momento perfecto para recordarme que si se puede y que los sueños se hacen realidad.

A **mis Abuelas**, Ana Imelda y Rosa por llevarme en sus oraciones cada día deseándome lo mejor en mi vida personal y profesional.

A **mis Tíos**, Alejandro y Daniel por brindarme su apoyo y sabiduría con los mejores consejos durante mi formación.

A **mi amiga** Andrea Garrido por ser tan especial a lo largo de mi carrera aun en la distancia. Por las experiencias vividas que se han vuelto inolvidables y el apoyo para continuar este logro que es de las dos.

A **mi amiga y hermana de vida**, por apoyarme siempre y acompañarme en momentos felices y otros no tanto, gracias Susana por todo y por esas palabras de aliento en cada momento que lo necesité.

A **ustedes Yosve y Audi**, amigas las quiero mucho. Conocerlas fue un final inesperado, las mejores amigas que me ha dejado la universidad, gracias por su apoyo.

Rosana Gutiérrez Aldana

TABLA DE CONTENIDO

Índice de Tablas.....	viii
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Gráficos.....	xi
Índice de Esquemas.....	xii
Resumen.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	3
Planteamiento del Problema.....	3
Justificación e Importancia de la Investigación.....	5
Objetivos de la Investigación.....	6
Objetivo General.....	6
Objetivos Específicos.....	6
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	7
Alcances de la Investigación.....	7
Limitaciones de la Investigación.....	7
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	9
Trabajos Previos.....	9
Antecedentes Históricos.....	10
Bases Teóricas.....	12
Familia <i>Pentaphylacaceae</i>	12
Género <i>Ternstroemia</i>	20
<i>Ternstroemia delicatula</i>	26
Productos Naturales.....	27
Extractos Vegetales.....	32
Tamizaje fitoquímico.....	33
Insomnio.....	45
Estudios experimentales <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	56
Definición Operacional de Términos.....	72
Operacionalización de las Variables.....	74

TABLA DE CONTENIDO

(Continuación)

CAPÍTULO III. MARCO METODOLOGICO	76
Tipo de Investigación	76
Diseño de la Investigación	76
Población y Muestra	77
Sistema de Variables	77
Instrumento de Recolección de Datos	78
Procedimiento o Metodología de la Investigación	78
Recolección e identificación del material vegetal	78
Secado del material vegetal	79
Preparación de los extractos	79
Tamizaje Fitoquímico	80
Determinación de la dosis letal media (DL ₅₀)	82
Determinación de la actividad sedante <i>in vivo</i>	83
Preparación de las muestras	85
Pruebas de conducta	86
Diseño de Análisis	90
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	91
Estudio fitoquímico de <i>Ternstroemia delicatula</i>	91
Dosis letal media (DL ₅₀)	95
Actividad sedante <i>in vivo</i>	95
Análisis estadístico de resultados	97
Discusión	101
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	104
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	106

INDICE DE TABLAS

1	Clasificación taxonómica de la familia Pentaphylacaceae	12
2	Algunos compuestos aislados de la familia Pentaphylacacea	16
3	Algunos compuestos obtenidos del género <i>Ternstroemia</i>	24
4	Diferencias entre metabolitos primarios y metabolitos secundarios	29
5	Medicamentos disponibles para el tratamiento de la ansiedad y del insomnio	52
6	Variable Dependiente. Efecto sedante de <i>Ternstroemia delicatula</i>	74
7	Variable Independiente. Metabolitos secundarios presentes en los extractos de los tallos y las hojas de <i>T. delicatula</i>	75
8	Grupo de estudio experimentales	84
9	Preparación de las muestras y grupos controles	86
10	Porcentaje de rendimiento de la especie <i>Ternstroemia delicatula</i>	91
11	Resultados obtenidos en las pruebas fitoquímicas de los extractos de <i>Ternstroemia delicatula</i>	92
12	Evaluación Toxicológica de los extractos de <i>Ternstroemia delicatula</i>	95
13	Resultados de la actividad locomotora espontanea en ratones Biou: NMRI, al administrar diferentes dosis de extracto de <i>Ternstroemia delicatula</i>	97
14	Resultados de la prueba recorrido del laberinto por los ratones Biou: NMRI, luego de aplicar diferentes dosis de extractos de <i>Ternstroemia delicatula</i> durante un periodo de 5 minutos	98
15	Tiempo en segundos de llegada a la meta de los ratones Biou: NMRI, luego de aplicar diferentes extractos de <i>Ternstroemia delicatula</i> en el modelo Laberinto durante un periodo de 5 minutos	99

INDICE DE FIGURAS

1	Distribución geográfica del género <i>Ternstroemia</i>	21
2	Fundamento químico de la reacción de Shinoda.....	35
3	Fundamento químico de la reacción de Lieberman-Bourchard.....	35
4	Fundamento químico de la Reacción con FeCl_3	36
5	Fundamento químico del ensayo de Baljet.....	36
6	Fases del sueño tipo REM y NO REM.....	39
7	Representación de la estructura del receptor GABA_A y sitios de unión a benzodiazepinas y alcohol.....	43
8	Modelo experimental de la especie <i>Rattus norvegicus</i>	60
9	Cepas de modelos experimentales de ratones (<i>Mus musculus</i>).....	61
10	Imagen modelo de un conejillo de Indias (<i>Cavia porcellus</i>).....	61
11	Conejos de experimentación de la especie <i>Oryctologus cuniculis</i>	62
12	Patrón de placa agujereada según Boisser.....	66
13	Modelo de la prueba de Rota Rod según Bhargava & Chandra y Kinnard & Carr.....	67
14	Modelo de Laberinto elevado en cruz (LCE).....	69
15	Patrón experimental de caja de campo claro-oscuro.....	69
16	Caja de acrílico para prueba de campo abierto.....	70
17	Cámara de actividad locomotora automatizada.....	71
18	Cajón con divisiones en laberinto.....	72
19	<i>Ternstroemia delicatula</i>	78
20	Trituración de la materia vegetal.....	79
21	Sistema de extracción continua a Reflujo.....	80
22	Evaporación del solvente por rota vapor.....	80
23	Ratón macho NMRI.....	83
24	Pesaje de los Animales.....	84
25	Grupo de Estudio Experimentales.....	85
26	Peso de los extractos y control positivo.....	86

INDICE DE FIGURAS

(Continuación)

27	Cámara de actividad locomotora automatizada.....	87
28	Posición vertical ratón macho NMRI.....	87
29	Actividad de laberinto.....	88
30	Pruebas fitoquímicas realizadas en los extractos de hojas y tallos de <i>Ternstroemia delicatula</i>	93
31	Pruebas fitoquímicas realizadas en los extractos de hojas y tallos de <i>Ternstroemia delicatula</i>	94
32	Administración de tratamiento vía oral.....	96

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE GRÁFICOS

1	Tratamiento con diferentes concentraciones de extractos de <i>Ternstroemia delicatula</i> en las pruebas de actividad locomotora espontanea.....	100
2	Tratamiento con diferentes concentraciones de extractos de <i>Ternstroemia delicatula</i> en las pruebas de Laberinto.....	101

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema

Procedimiento de la Investigación.....89

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”



ACTIVIDAD SEDANTE Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS DE *Ternstroemia delicatula*

Trabajo de Grado II

Autor (as):

Castillo R. Leslie G.

Gutiérrez A. Rosana Y.

Tutor: Prof. Alida Pérez

Co-tutor: Prof. Ysbelia Obregón

RESÚMEN

El objetivo del presente estudio fue realizar el análisis fitoquímico y evaluar los efectos sedativos de los extractos de las hojas y tallos de *Ternstroemia delicatula*. El material vegetal se recolectó cerca de la comunidad del Tigre Edo. Anzoátegui, en la localidad de "Farallones de Chimire" (Venezuela). A partir de 200 g de hojas y tallos se prepararon los extractos de hexano y etanol mediante la técnica de extracción continua a reflujo. La composición química fue determinada a través de pruebas químicas cualitativas de coloración y/o precipitación. La actividad sedante se realizó *in vivo* en once (11) ratones machos cepa Naval Medical Research Institute (NMRI) divididos en 6 grupos: grupo A (control negativo: Solución salina fisiológica), grupo B (etanol hoja 5 mg/Kg), grupo C (etanol tallo 5 mg/Kg), grupo D (control positivo: Nitrazepam 5 mg) grupo F (etanol hoja 160 mg/Kg), grupo G (etanol tallo 160 mg/Kg). Los modelos de ensayo fueron: actividad locomotora espontánea y actividad exploratoria de laberinto. Los grupos B y F correspondientes a los extractos etanólicos de las hojas, no mostraron estadísticas significativas en ninguno de los modelos de ensayo. Por su parte el grupo G correspondiente al extracto etanol de tallo produjo cambio en los ratones comparado con el grupo A siendo estos estadísticamente significativos ($p < 0,05$) y presentando actividad de tipo sedante en el modelo de actividad locomotora espontanea. Los resultados del tamizaje fitoquímico revelaron la presencia de triterpenos/esteroles para los cuatro extractos; y el extracto de etanol presento además: compuestos fenólicos, flavonoides y saponinas.

Palabras claves: *Ternstroemia delicatula*, tamizaje fitoquímico, efecto sedante, ratón NMRI

INTRODUCCIÓN

La contribución que los productos de origen vegetal dan a los procedimientos terapéuticos ha variado a lo largo del tiempo, en relación con los avances del conocimiento científico. Análogo al desarrollo tecnológico de la industria farmacéutica, se ha evidenciado gran interés por parte de los investigadores estudiar sustancias naturales que posean algunas propiedades farmacológicas. La vinculación de la medicina tradicional con la medicina científica a través de la investigación etnobotánica, el estudio de los principios activos y la validación de la actividad terapéutica de las plantas, permite disponer de recursos regionales naturales para el tratamiento de las enfermedades que afectan comúnmente a la población (Mejía, 1990).

Algunas especies de diferentes familias relacionadas a las *Ternstroemia*, como Ericaceae y Sapotaceae, presentan múltiples usos en distintos campos, como en medicina, en la agricultura, en la industria alimentaria y hasta en la elaboración de detergentes. Dichas familias tienen en común la presencia de ciertos metabolitos secundarios como los terpenos, los compuestos fenólicos y los alcaloides, unos en mayor proporción que otros, que aportan las propiedades necesarias para su respectivo uso (Chinou, 2008), de las cuales se han determinado innumerables efectos terapéuticos. No obstante, aún existen propiedades medicinales de las mismas que faltan por estudiarse, sobre todo en el campo de la fitoterapia y su actividad sedante, específicamente para la especie *Ternstroemia delicatula* (Trópicos, 2014).

Estudios farmacológicos han demostrado que los frutos de especies de *Ternstroemia* producen efectos sedantes y anticonvulsivos en ratas y actúan como depresores del Sistema Nervioso Central (SNC) (Balderas, Alfaro, Monroy López, Rivero, y Navarrete, 2013). Sin embargo, no hay informes adicionales sobre los efectos neurofarmacológicos de *Ternstroemia delicatula*. Por lo tanto, este estudio se realizó con el objetivo de evaluar la actividad sedante y la composición química de los extractos de *T. delicatula* usando varios modelos experimentales para identificar los principios activos de esta planta medicinal.

El siguiente trabajo de investigación ha sido estructurado en V capítulos. El Capítulo I, denominado El Problema, contiene los siguientes elementos: Planteamiento del Problema, Justificación de la Investigación, Objetivos, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II, llamado Marco Teórico abarca: Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las Variables e Hipótesis. El Capítulo III, titulado Marco Metodológico comprende los siguientes puntos: Tipo y Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Instrumento de Recolección de Datos y Procedimientos de la Investigación, Diseño de Análisis y Variables Estadísticas. El Capítulo IV, denominado Resultados y Discusión. El Capítulo V, llamado Conclusiones y Recomendaciones.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

El insomnio es un trastorno que engloba problemas físicos, mentales, ambientales y conductuales, de éstos, la conducta y los problemas fisiológicos son los mayores transgresores de los procesos biológicos primarios; por ejemplo, el uso social o terapéutico de ciertas drogas y los trastornos del ritmo circadiano son condiciones que ocasionan o agravan el problema. La prevalencia de cualquier alteración psiquiátrica es dos o tres veces mayor en pacientes con alteraciones del sueño. Las quejas de insomnio pueden ser marcadores tempranos para el surgimiento de alteraciones psiquiátricas como la depresión, ansiedad y abuso del alcohol, mismas que son asociadas con un mayor riesgo de suicidio. Esto aumenta la posibilidad de que el tratamiento del insomnio pueda reducir el riesgo de las condiciones psicológicas (Haro, Labra y Sánchez, 2010).

Para tratar el insomnio suelen utilizarse sedantes como las benzodiacepinas, las cuales son sustancias químicas que deprimen el sistema nervioso central (SNC), provocando diversos efectos tales como, la calma, relajación, reducción de ansiedad, adormecimiento y retardo de ciertos reflejos, que provocan relajación física y mental por su acción, sobre los receptores gabaérgica. La utilización prolongada de estos sedativos aumenta el riesgo de caídas en pacientes ancianos y disminuye los niveles de atención. Dada la amplia variabilidad de problemas vinculados con el consumo sin prescripción en la población, los tratamientos farmacológicos tradicionales disponibles muestran limitaciones y surge la necesidad de incluir intervenciones no convencionales en los cuidados clínicos de rutina (Bucciarelli, Jouglard, Mancini,

Lloret, Rubio y Skliar, 2010), como alternativa, según la premisa hipocrática: lo primero, no hacer daño «primum non nocere», está la fitoterapia (Viniegra, Parellada, Miranda, Parellada, Planas y Momblan, 2015).

En las últimas décadas se ha incrementado el interés por los productos naturales y sus posibles aplicaciones en la industria farmacéutica en búsqueda de nuevos medicamentos más seguros y eficaces, aproximadamente el 30 % de los fármacos empleados en los países industrializados proceden o se han sintetizado a partir de productos vegetales, por lo que los extractos de plantas son una fuente atractiva de nuevos medicamentos (Egwaikhede, Okeniyi y Gimba, 2009). En Latinoamérica, específicamente en Venezuela, el uso de las plantas como alternativa para relajar, tratar el sistema nervioso y como sedantes para dormir es muy frecuente ya que son de fácil alcance y es un sustituto natural de los fármacos. El consumo de plantas sedativas era muy común para adormecer los dolores de muelas, o simplemente para poder dormir mejor (Lairer, Peña y Vélez, 1942).

En tal sentido, especies del género *Ternstroemia* (Pentaphylacaceae) se usan en la medicina tradicional para aliviar la ansiedad, trastornos del sueño y convulsiones (Balderas y cols., 2013). En Venezuela se ha reportado la existencia de *Ternstroemia delicatula* en el estado Anzoátegui, según la revisión bibliográfica realizada esta especie no cuenta con estudios químicos y farmacológicos previos, motivo por el cual las investigadoras se plantearon las siguientes interrogantes:

¿Cuál es la relación entre la composición química de los extractos de hojas y tallos de *T. delicatula* y su actividad sedante?

¿Los extractos de *T. delicatula* presentan actividad sedante *in vivo* sobre ratones machos NMRI?

Justificación de la Investigación

La búsqueda de nuevas sustancias y la innovación de nuevos medicamentos cuya actividad sea prevalentemente sobre el SNC suman cada día más, debido a uno de los factores más comunes, “los efectos adversos, colaterales y la dependencia que causan el uso de fármacos de origen sintético”; de ahí la necesidad e importancia de buscar principios activos presentes en especies vegetales, los cuales no posean desventajas ni conduzcan a una dependencia psíquica. Esto basándose en la declaración de Alma Ata 1978 y tras el enunciado de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en Tokio en el año 2000 quienes hacen referencia a respaldar el empleo de especies vegetales como fuente de nuevos fármacos (Rocabado, Gonzáles, De La Fuente y Araya, 2011).

En la actualidad debido a la tradición y situación económica en que se encuentra el país, un gran número de habitantes, utilizan plantas para recobrar y mantener la salud, fundamentándose únicamente en conocimientos empíricos diseminados en las distintas comunidades a través de los años, por lo que es importante y necesario validar científicamente esta información para poder contar con alternativas para el tratamiento de las enfermedades más comunes y que sean accesibles para la mayoría de la población (Organización Mundial de la Salud, 2002-2005).

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, investigaciones previas del género *Ternstroemia* establecen que varias especies tienen propiedades sedantes (Balderas y Reza, 2008), desde esta perspectiva se aborda el estudio de la especie vegetal *Ternstroemia delicatula*, para determinar la composición química y el efecto sedante, contribuyendo de esta manera con la validación de especies vegetales con actividad sobre el SNC.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la relación entre la composición química y el efecto sedante *in vivo* de los extractos de *Ternstroemia delicatula*.

Objetivos Específicos

Obtener los extractos de hexano y etanol de las hojas y los tallos de la *T. delicatula* a través de la extracción bajo reflujo.

Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en los extractos previamente obtenidos de *T. delicatula* mediante pruebas químicas de coloración y/o precipitación.

Determinar el efecto sedante *in vivo* de los extractos etanólicos de hojas y tallos de *Ternstroemia delicatula* en ratones machos BIOU:NMRI mediante los ensayos de la actividad locomotora espontánea y de laberinto.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

El alcance de una investigación se relaciona especificando con claridad y precisión la profundidad del conocimiento sobre el fenómeno de estudio. Establece la visión que posee el investigador para lograr los objetivos. Del alcance depende la estrategia de investigación, así, el diseño, los procedimientos y otros componentes del proceso serán distintos en estudios con alcances descriptivo, exploratorio y correlacional (Hernández, Fernández y Baptista, 2010). La siguiente investigación presenta como alcance atribuir nuevos conocimientos relacionados con la determinación de la actividad sedativa de los componentes químicos presentes en los extractos de las hojas y tallos de *Ternstroemia delicatula* en ratones machos Biou:NMRI y aportar información de interés sobre la relación entre la composición química de la planta y la actividad, en este sentido fomentar su uso en la medicina tradicional para la terapia contra el insomnio.

Limitaciones de la Investigación

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación se presentaron limitaciones relacionadas con los aspectos teóricos, técnicos y recursos económicos (Hernández, Fernández y Batista, 2010). Dichas limitaciones presentadas durante el desarrollo de la investigación fueron:

- Recursos económicos para cubrir los gastos de fletes al momento de trasladar y obtener la especie vegetal *Ternstroemia delicatula* desde el estado Anzoátegui hasta el estado Mérida (Financiamiento propio)
- Financiamiento para realizar la actividad biológica (adquisición de los ratones, recursos propios).
- Fallas en cuanto a la disponibilidad de los servicios de agua, luz y gas que afectaron la realización de los análisis químicos y estudios biológicos.

- Intermittencia de las comunicaciones de telefonía e internet lo que dificultó la revisión bibliográfica y correcciones del manuscrito por parte de los evaluadores.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos previos

Li y cols (2019), realizaron el análisis químico del extracto etanólico de las partes aéreas *Ternstroemia gymnanthera* obteniendo cuatro nuevos feniletanoides glicosidados identificados como tergimnósidos A-D. Adicionalmente, determinaron la actividad analgésica *in vivo* mediante el método del ácido acético, el efecto analgésico fue superior al medicamento estándar (aspirina: 55,3 % a 200 mg/Kg) y equivalente a la indometacina (58,2 % a 50 mg/Kg), estuvo en un rango de 56,2 a 65,3 % a una dosis de 50 mg/Kg. Estos resultados se relacionan con la presente investigación ya que los metabolitos secundarios aislados de *T. gymnanthera* podrían estar presentes en *T. delicatula* y atribuirle de igual manera propiedades analgésicas a esta especie.

De igual modo, en el 2017, Moreno, Sánchez, Vázquez, Hernández y García evaluaron la composición química y la actividad antiinflamatoria, analgésica y antioxidante de los extractos de hexano, cloroformo y etanol de las partes aéreas de *Ternstroemia sylvatica*. El análisis fitoquímico cualitativo reveló la presencia de esteroides, terpenoides, flavonoides, cumarinas, lignanos y alcaloides. El efecto antiinflamatorio y analgésico fue determinado *in vivo* mediante los métodos de edema inducido en la pata por carragenina y el de contorsiones producidas por ácido acético, respectivamente. Por otra parte, el potencial antioxidante fue evaluado por el método de captación del radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). El extracto etanólico fue el más activo, presentó una actividad antiinflamatoria de 56,34 % (250 mg/Kg) y

50,70 % (500 mg/Kg), la actividad analgésica fue de 30,60 % y el efecto antioxidante de 68,70 %. Este trabajo confirma el valor medicinal de *Ternstroemia sylvatica* con propiedades antiinflamatorias y analgésicas, cuyo mecanismo parece estar asociado a su efecto antioxidante y apoya sus uso en la medicina tradicional mexicana.

De igual modo, Salgado y cols (2015), determinaron la actividad antioxidante y citotóxica de los extractos metanólicos de hojas, flores, frutos y semillas de *Ternstroemia pringlei*. La actividad antioxidante fue establecida *in vitro* e *in vivo* mediante el método del 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y el modelo de protección H₂O₂ con *Saccharomyces cerevisiae*. La actividad citotóxica se evaluó *in vitro* mediante ensayo de tinción de la proteína sulforrodamina B contra las líneas de células cancerosas HF-6 (colón), PC-3 (próstata), MCF-7 (mama) y SiHa (cervical). Los extractos de las hojas y los frutos fueron los que tuvieron mayor actividad antioxidante en el ensayo *in vitro* con una concentración inhibitoria media (CI₅₀) de 33,91 y 38,09 µg/mL. La evaluación *in vivo* del potencial antioxidante demostró que el extracto de los frutos era el más activo a una concentración de 250 µg/mL. Ningún extracto fue activo frente a las líneas celulares cancerosas evaluadas (CI₅₀ > 20 µg/mL). Adicionalmente, se aisló del extracto de las hojas el ternstrosido B, un conocido feniletanoide glicosidado con una fuerte acción antioxidante. La presencia de este tipo de metabolitos abre nuevas perspectivas de investigación para la planta y de otras especies del mismo género.

Antecedentes Históricos

Desde tiempos ancestrales muchas culturas alrededor del mundo han utilizado empíricamente los productos naturales, en forma de drogas crudas como tinturas, té, infusiones, polvos y otras formulaciones herbales para el tratamiento de diversas patologías (Atanasov y cols., 2015). Su uso se ha dado y prevalece, aun sin que en un principio se tuviera conocimiento acerca de su mecanismo de acción, actividad

farmacológica y constituyentes activos, convirtiéndolos en una fuente de partida para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad farmacológica para el tratamiento de diversas patologías (Balunas y Kinghorn, 2015).

Las poblaciones alrededor del mundo siguen utilizando las plantas con propiedades medicinales como resultado de circunstancias históricas, utilización etnobotánica o creencias culturales que ayudan a satisfacer sus necesidades sanitarias. En países en vías de desarrollo, el amplio uso de este tipo de terapias se atribuye a su accesibilidad y asequibilidad, y muchas veces es la única fuente disponible de atención sanitaria, especialmente para los pacientes de más escasos recursos; y además es popular por estar firmemente arraigada en los sistemas de creencias. Por su parte, la Organización Mundial para la Salud (OMS) ha insistido en que el uso de plantas medicinales puede ser de gran aplicación en la atención primaria de los sistemas de salud, pero sobre bases científicas que sustenten seguridad, efectividad y calidad requeridas para administración en humanos (Organización Mundial de la Salud, 2002-2005).

En tal sentido, la OMS ha promovido la utilización de todos los recursos existentes sin discriminaciones ideológicas ni políticas reconsiderando la potencialidad, eficacia y aceptación de las medicinas tradicionales en las culturas populares. Las principales estrategias desarrolladas para lograr esta meta han sido las investigaciones de las plantas medicinales, para conseguir una validación científica de los tratamientos herbolarios, y la movilización y capacitación de los recursos humanos de la medicina tradicional para así aprovechar mejor sus propiedades en beneficio de la salud a bajos costos (Organización Mundial de la Salud, 2002-2005).

Bases Teóricas

Familia Pentaphylacaceae

La familia Pentaphylacaceae pertenece al orden Ericales y comprende cuatro tribus: Sladenieae, Pentaphylaceae, Frezieraee y Ternstroemieae, está representada por 14 géneros y aproximadamente 345 especies distribuidas en Asia, África, el Pacífico y América Central y del Sur (Stevens 2001; Weitzman, Dressler y Stevens, 2004; Santamaría y Lagomarsino, 2015; Tsou, Li y Vijayan, 2016).

Aspectos botánicos

Las especies de esta familia, en general, comprenden árboles o arbustos con hojas simples y alternas, con bordes enteros, dentados o aserrados. Las flores son solitarias y axilares, sostenidas en la base por dos brácteas parecidas a los sépalos que pueden encontrarse libres o unidos en la base y persistentes con el fruto. Los pétalos pueden ser pocos o a veces numerosos, libres o unidos en la base, generalmente alternando con los sépalos. Posee estambres de 5 a 10, o muchos, libres o unidos en la base de la corola y formando un anillo. Los frutos en cápsulas o bayas con semillas ariladas. Anteriormente los miembros de la familia Pentaphylacaceae eran incluidos en familia Theaceae, taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera (Tabla 1) (Tsou y cols., 2016):

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la familia Pentaphylacaceae

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ericales
Familia	Pentaphylacaceae
Tribus	Sladenieae, Pentaphylaceae, Frezieraee, Ternstroemieae
Géneros	<i>Archboldiodendron</i> , <i>Adinandra</i> , <i>Anneslea</i> , <i>Balthasaria</i> , <i>Cleyera</i> , <i>Eurya</i> , <i>Euryodendron</i> , <i>Ficalhoa</i> , <i>Freziera</i> , <i>Sladenia</i> , <i>Pentaphylax</i> , <i>Symplococarpon</i> , <i>Ternstroemia</i> , <i>Visnea</i> .

Tomada y modificada de: Tsou y cols., 2016.

Distribución geográfica

La familia Pentaphylacaceae se distribuye a nivel mundial, en el este de Asia, se encuentran los géneros *Eurya* Thunb, *Adinandra* Jack, *Anneslea* Wall, *Archboldiodendron* Kobuski, *Euryodendron* H.T. Chang y *Pentaphylax* Gardner y Champ; en África, *Balthasaria* Verdc, *Ficalhoa* Hiern y *Visnea* L. f; en América *Freziera* Willd y *Symplocarpon* Airy Shaw. Además, la familia cuenta con dos géneros distribuidos en dos o más continentes, *Cleyera* Thunb, se encuentra en la región Neotropical y Asia, y *Ternstroemia* Mutis. Ex L.f, se localiza en la región Neotropical, África y Asia (Zhang y Schönenberger, 2014).

Composición química y actividad biológica

Los géneros pertenecientes a la familia Pentaphylacaceae han sido poco estudiados, debido a que tienen solo una o pocas especies, que se encuentran en áreas remotas y limitadas (Tsou y cols., 2016), en tal sentido, a continuación se presentan algunos aspectos relacionados con el estudio de los metabolitos secundarios y actividad biológica de algunos géneros de esta familia.

El género *Eurya* (Pentaphylacaceae) contiene más de 100 especies distribuidas a nivel mundial (Oh, Baik, Yoo, Kang y Lee, 2011), estudios biológicos previos reportan para *E. marginata* y *E. japónica* actividad anticancerígena (Park y cols., 2005), antiinflamatoria (Park y cols., 2005) antioxidante (Yang y cols., 2013) y antibacteriana (Rosalind, Dutta y Paul, 2011). Adicionalmente, los análisis fitoquímicos han establecido la presencia de lignanos, flavonoides y fenilpropanoides (Yang y cols., 2013; Rosalind y cols., 2011).

En relación a lo expuesto anteriormente, (Oh y cols., 2011) aislaron fenilpropanoides del extracto etanólico de las hojas y tallos de *E. marginata*, los compuestos obtenidos fueron identificados como eutigósido B (1), eutigósido C (2), eutigósido D (3), eutigósido E (4), ácido cinámico (5), rengiolona (6) y cleroindicina

B (7) (Tabla 2). De modo similar, de las hojas, frutos y flores de *E. japónica* reportan el aislamiento de flavonoides y triterpenos. Inada y cols (1989) obtuvieron del extracto de acetato de etilo de las flores de *E. japónica* flavonoides y derivados de la ciclohexanona, estos compuestos se identificaron como euryanosido (8), cornosido (9) y rengiolona (6). Adicionalmente, Motooka y cols (2015), mediante el análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas establecieron como componentes mayoritarios del aceite esencial de las flores de *E. japónica* linalool (14,0 %), 9-Z-tricoseno (12,0 %) y nonanal (7,4 %) mientras que el aceite de las partes aéreas contenía linalool (37,7 %), α -terpeneol (13,5 %) y geraniol (9,6 %).

De igual modo, el género *Adinandra* (Pentaphylacaceae) ha sido estudiado, la especie *A. nítida* posee propiedades medicinales como hipotensora, antibacteriana, antioxidante y analgésica (Ying, 2003). Al respecto, Liu, Yang, Ma, Yuan y Chen (2010) aislaron y cuantificaron el contenido de flavonoides mediante cromatografía líquida de alta resolución y establecieron la actividad antioxidante a través del método del radical difenil-picril-hidracilo (DPPH) del extracto etanólico de las hojas de *A. nítida*. En este estudio se obtuvieron tres flavonoides (Tabla 2) denominados camellianina A (10), camellianina B (11) y apigenina (12), encontrándose según el análisis cromatográfico en una proporción equivalente a 41,98 %; 2,67 % y 1,73 %, respectivamente, mientras que la actividad antioxidante fue baja. Sin embargo, Liu, Ma, Liu, Yang y Zhang (2013), establecieron que la camellianina A (10), tiene una fuerte actividad antioxidante con una CI_{50} de 0,2 mg/mL. Por otra parte, Gao, Liu, Liu y Chen (2010), determinaron que este compuesto, tiene un efecto antiproliferativo y produce apoptosis sobre células HP-2 (carcinoma hepático) y MCF-7 (carcinoma cerebral) a una concentración de 200 μ m.

Por otra parte, los componentes químicos del género *Cleyera* (Pentaphylacaceae) han sido investigados aislando diversos ácidos y derivados glicosidados. Por ejemplo, del extracto acuoso de las hojas de *C. ochracea* se obtuvieron los ácidos jasmónico y cucúrbico (Ueda y Kato, 1982) y del extracto metanólico se aisló un derivado

glicosidado del ácido gálico que fue identificado como 3-hidroxi-5-metilfenol-1-O- β -D-(6'-galloil)-glucopiranosido (**13**), este compuesto produce la inhibición de la enzima oxido nítrico sintetasa a nivel neuronal (Iwakawa, Tanaka y Takashima, 2001).

Asimismo, de *C. japónica*, Kim, Kim, Hyun y Lee (2012) también reportan el aislamiento de flavonoides como la taxifolina y sus glucósidos, proantocianidina A-1 y taninos hidrolizables (Oh, Park, Kim, Kim y Lee, 2013). Del extracto etanólico de las hojas y tallos de esta planta se obtuvieron compuestos fenólicos que fueron caracterizados químicamente como ácido-3,3'-di-O-metilelágico (**14**), ácido-3,3'-di-O-metilelágico-4'-O- β -D-xilofuranósido (**15**), 3,5,7-trihidroxicromona-3-O- α -L-arabinofuranósido (**16**) y aviculina (**17**), posteriormente, se determinó la inhibición de la oxidación de la L-Tirosina catalizada por tirosinasa de hongo, siendo el compuesto **15** el que inhibió la tirosinasa con un valor de CI_{50} de 0,078 mM, que es aproximadamente tres veces más activa que la arbutina (control positivo, IC_{50} = 0,25 mM), la inhibición de la tirosinasa permite la regulación de la melanina polimérica que es de importancia tanto desde el punto de vista médico como cosmético para los seres humanos (Kim, Oh, Hyun y Lee, 2014).

De igual manera, otro género de interés perteneciente a la familia Pentaphylacaceae es el género *Anneslea*, del cual se han realizado investigaciones sobre la especie *A. fragrans*, logrando aislar diversos componentes entre los cuales resaltan los biflavonoides denominados fraganol A (**18**), fraganol B (**19**) y fraganol C (**20**) obtenidos del extracto etanólico de los tallos, la citotoxicidad de estas sustancias fue evaluada frente a la línea celular de cáncer de páncreas humano (PANC-1) siendo inactivos a la concentración máxima probada de 100 μ M (Omar, Dibwe, Tawila, Sun, Phrutivorapongkul y Awale, 2019)

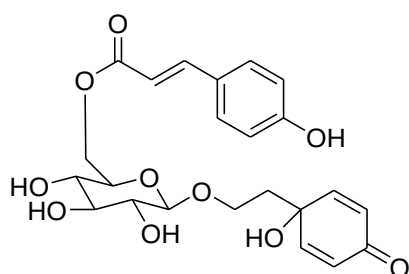
Adicionalmente, hay reportes de la obtención de dihidrochalconas glicosidadas de las hojas y raíces de esta especie, esto compuestos fueron identificados como fraganona A (**21**), fraganona B (**22**), davidigenin-2'-O-(6''-O-siringoil)- β -glucósido (**23**), davidigenin-2'-O-(6''-O-4'''-hidroxibenzoil)- β -glucósido (**24**), davidigenin-2'-O-(2''-O-4'''-hidroxibenzoil)- β -glucósido (**25**), davidigenin-2'-O-(3''-O-4'''-

hidroxibenzoil)- β -glucósido (26). Se evaluaron los compuestos 21-22 contra la línea celular PANC-1 encontrando que la fraganona A (21) suprime la migración de estas células cancerosas (Omar y cols 2019; Huang, Ko, Jin, Yang, Shih y Chen, 2012).

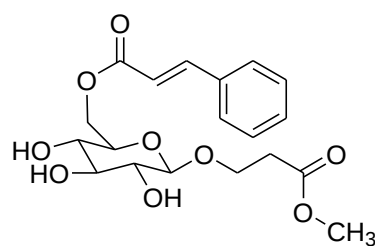
Por último, del género *Visnea* (Pentaphylacaceae) hay publicaciones sobre investigaciones fitoquímicas de la especie *V. mocanera* que revelan la presencia de numerosos compuestos como el lupeol, sitosterol y ácidos triterpénicos (betulínico, oleanólico, ursólico) en la hojas, estas sustancias poseen propiedades antimicrobianas (Hernández, López, Rabanal, Dariasa y Arias, 1994). Adicionalmente, los análisis de las semillas de los frutos demostraron que poseen catequinas y flavonoides los cuales le confieren una buena actividad antioxidante (Dueñas, Hernández, Estrella y Rabanal, 2003).

Las evidencias anteriores demuestran que los géneros y especies pertenecientes a la familia Pentaphylacaceae poseen metabolitos secundarios biológicamente activos, en consecuencia, en la presente investigación se estudiará una especie del género *Ternstroemia* con la finalidad de aportar evidencia científica sobre la composición química y actividad sedante de *T. delicatula*.

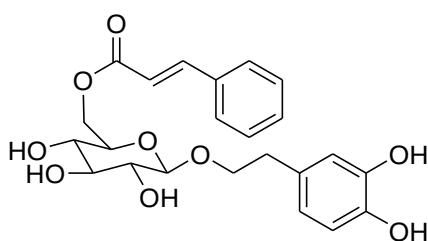
Tabla 2. Algunos compuestos aislados de la familia Pentaphylacaceae.



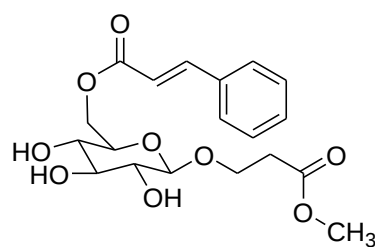
Eutigósido B (1)



Eutigósido C (2)

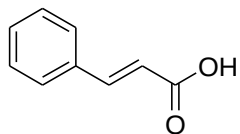


Eutigósido D (3)

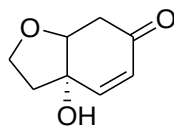


Eutigósido E (4)

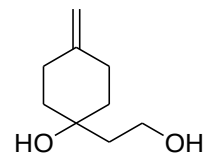
Tabla 2. Algunos compuestos aislados de la familia Pentaphylacaceae.



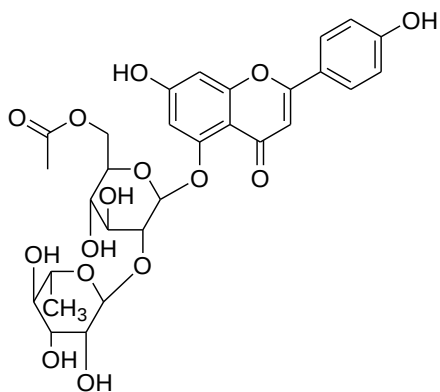
Acido cinámico (5)



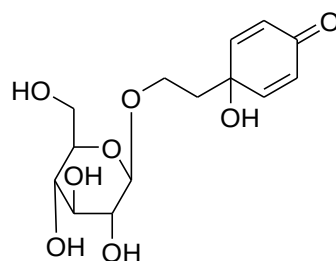
Rengiolona (6)



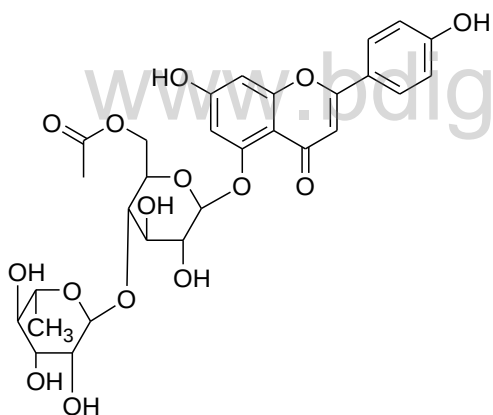
Cleroindicina B (7)



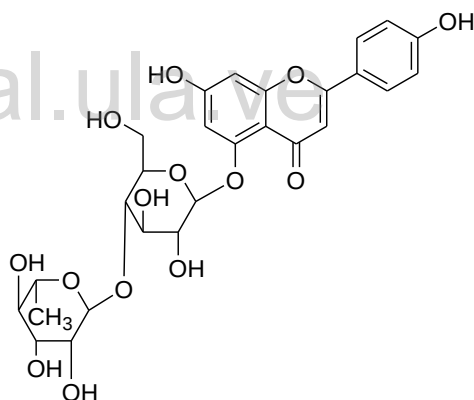
Euryanosido (8)



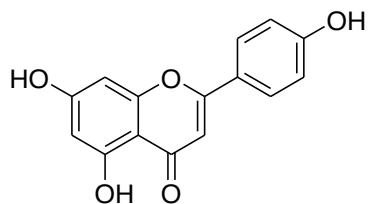
Cornosido (9)



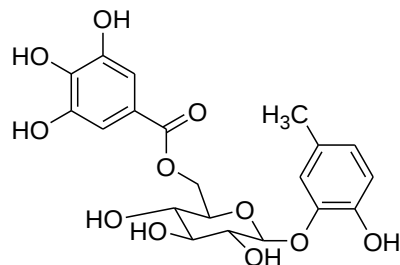
Camellianina A (10)



Camellianina B (11)

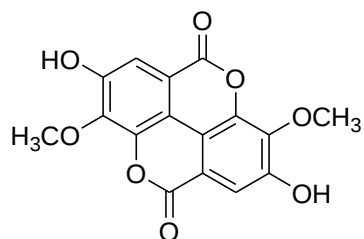


Apigenina (12)

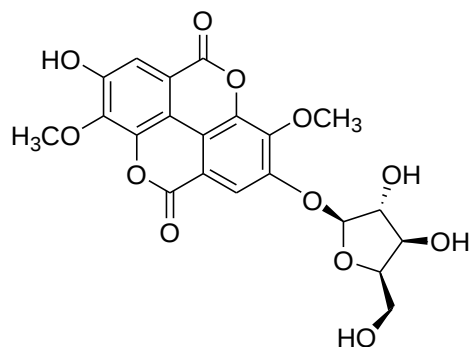


3-hidroxi-5-metilfenol-1-O- β -D-(6'-galloil)-glucopiranósido (13)

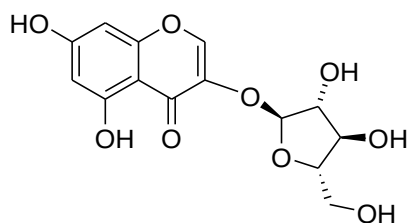
Tabla 2. Algunos compuestos aislados de la familia Pentaphylacaceae.



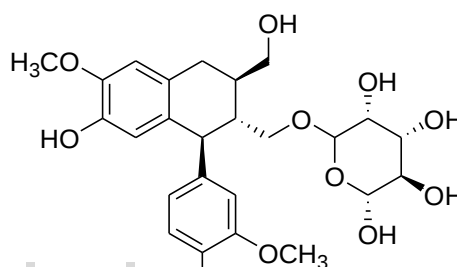
Ácido-3,3'-di-O-metilelágico (14)



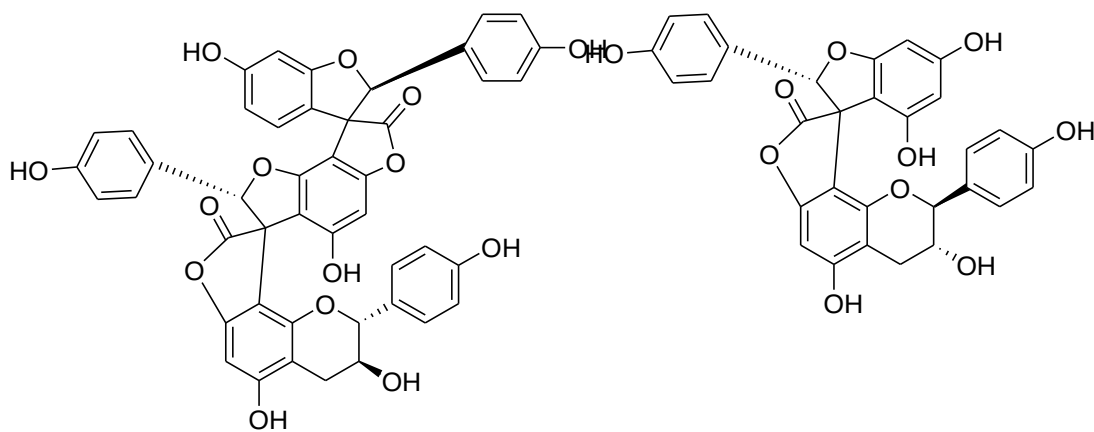
Ácido-3,3'-di-O-metilelágico-4'-O-β-D-xilofuranósido (15)



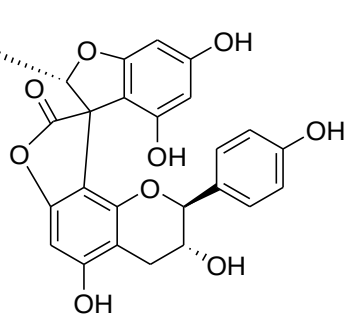
3,5,7-trihidroxicromona-3-O-α-L-arabinofuranósido (16)



Aviculina (17)

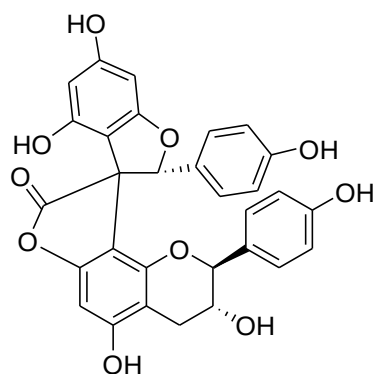


Fraganol A (18)

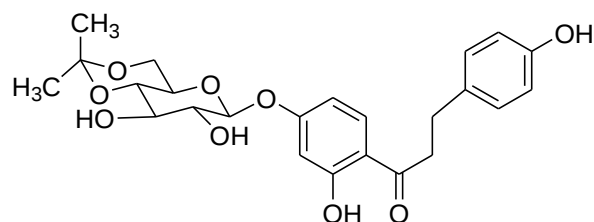


Fraganol B (19)

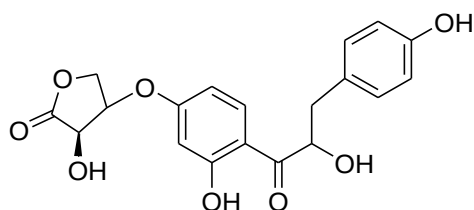
Tabla 2. Algunos compuestos aislados de la familia Pentaphylacaceae.



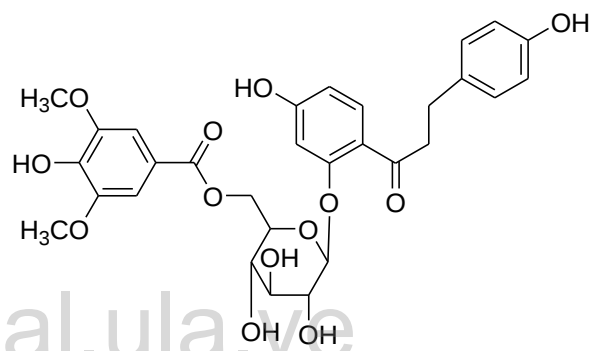
Fraganol C (20)



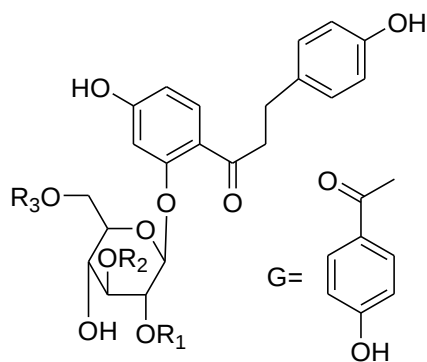
Fraganona A (21)



Fraganona B (22)



Davidigenin-2'-O-(6''-O-syringoyl)-β-glucósido (23)



24= R₁=H, R₂=H, R₃=G
 25= R₁=G, R₂=H, R₃=H
 26= R₁=H, R₂=G, R₃=H

Davidigenin-2'-O-(6''-O-4'''-hidroxibenzoil)-β-glucósido (24)

Davidigenin-2'-O-(2''-O-4'''-hidroxibenzoil)-β-glucósido (25)

Davidigenin-2'-O-(3''-O-4'''-hidroxibenzoil)-β-glucósido (26)

Género *Ternstroemia*

El género *Ternstroemia* Mutis ex Linnaeus F. está integrado por más de 100 especies, ubicadas en el trópico y subtrópico de América, África y Asia. En América están distribuidas cerca de 85 especies, la mayoría en Centroamérica; varias plantas de *Ternstroemia* son usadas en la medicina tradicional para aliviar la ansiedad, trastornos del sueño y convulsiones (Balderas y Reza, 2008).

Aspectos botánicos

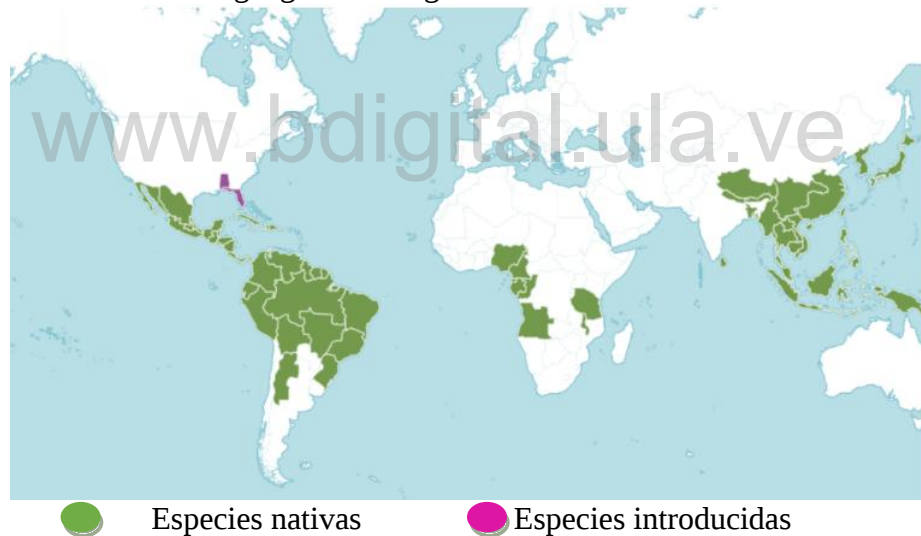
El género *Ternstroemia* pertenece a la tribu Ternstroemieae, sus especies son arbustos o árboles, de hojas perennes dispuestas en espiral con frecuencia en la punta de las ramas, simples, enteras o serradas (cuando son jóvenes), las flores son generalmente de color blanco o rosa, solitarias o en grupos axilares principalmente con 5 pétalos y con frecuencia de olor fuerte, el fruto es una cápsula generalmente loculicida, indehisciente como una pepita; en algunas especies las semillas son aladas, en otras están cubiertas por un tejido carnoso, el embrión puede tener una forma de herradura o ser recta (Balderas y Reza, 2008).

Las especies de este género presentan ovario súpero y frutos capsulares con dehiscencia septifraga biccida, más o menos irregular o circuncisa, en el último de cuyos casos puede hablarse de auténticos pixidios, con línea de dehiscencia basal, y semillas relativamente grandes, normalmente de más de 1 cm de longitud, lisas y cubiertas por papilas de color rojo o púrpura. Las hojas tienen filotaxis alterna helicoidal, las flores son relativamente grandes (generalmente de más de 1 cm de diámetro) y ciertos caracteres seminales y anatómicos, entre los cuales destacan las esclereidas mesofilares, conspicuamente ramificadas (Grande, 2018).

Distribución geográfica

El género *Ternstroemia* es de distribución pantropical (Figura 1), se extiende a áreas subtropicales y templadas (Stevens 2001; Weitzmann, Dressler y Stevens, 2004). Se estima que contiene de 100 a 152 especies (Stevens 2001; Plants of the World Online, 2018). De esas 152 especies, 101 son neotropicales, 3 se encuentran en África, 31 en Malasia (SE Asia), 1 en Australia (*T. cherryi* (F. M. Bailey) Merr. ex J. F. Bailey & C. T. White), 15 especies in China, Indo-China, Japón y el Tibet, y 1 especie, *T. gymnanthera* (Wight y Arn.) Bedd, en la India. La mayoría de estas plantas son de montaña y submontaña y están ausentes de los hábitats de las tierras bajas (Cheek, Haba, Konomou y Van Der Burgt, 2019).

Figura 1. Distribución geográfica del género *Ternstroemia*



Tomado y modificado de <http://www.plantsoftheworldonline.org>.

Aspectos químicos y biológicos

Análisis fitoquímicos de especies de *Ternstroemia* reportan el aislamiento de triterpenos de tipo oleanano y ursano, saponinas triterpénicas, carotenoides, monoterpenos, taninos y compuestos aromáticos (Balderas y cols., 2013), a

continuación se presentan algunos aspectos relacionados con la composición química y actividad biológica de algunas especies de este género.

Estudios realizados a las especies asiáticas del género *Ternstroemia*, han descrito la presencia de terpenos y compuestos aromáticos del extracto metanólico de hojas de *T. gymnanthera* (Tori y Fukuyama, 2005) y triterpenos tipo ursano y oleanano así como barrigenol A₁, ácido ursólico, ácido corosólico, sitosterol y estigmasterol y cuatro nuevos terpenos caracterizados espectroscópicamente como ácido 3-epi-coros-lactona-(2 α ,3 α -dihidroxiurs-11-eno-13 β ,28-olvido) (27), ácido 3-epi-ternstroem-(2 α ,3 α -dihidroxiurs-12-eno-11-ona-28-oico) (28), ácido ternstroem-(2 α ,3 β -dihidroxiurs-12-eno-11-ona-28-oico) (29) y ácido gimnanter-(22 α ,3 α -dihidroxi-11 α -metoxiurs-12-eno-28-oico) (30) (Ikuta, Tomiyasu, Morita y Yoshimura, 2003). Adicionalmente, Li y cols., 2019, reportan la obtención de cuatro nuevos fenilpropoanoides glicosidados que fueron denominados terngimnosidos A–D (31–34) (Tabla 3). Las hojas de *T. gymnanthera* se han utilizado durante mucho tiempo para tratar la malaria en Taiwán. Además, hay análisis que establecen que esta planta posee propiedades astringentes, anticancerígenas, analgésicas y antiinflamatorias (Venkatesan, Park, Choi, Lee y Kim, 2017; Li y cols., 2019).

Por otra parte, de los extractos con butanol y acetato de etilo de los frutos de *Ternstroemia japonica* se han obtenido respectivamente saponinas triterpenoidales: ternstroemiósidos A-F (35–40), jacaranona (41) y sus derivados 3-hidroxi-2,3-dihidrojacaranona (42) y 3-metoxi-2,3-dihidrojacaranona (43) (Shin y Wang, 2003; Jo y Suh, 2005). De igual modo, de las hojas de esta especie se aisló un flavonoide caracterizado como 3-O- β -D-xilopiranosil-(1-2)- β -D-glucopiranosil-kaempferol-4'-O- β -D-glucopyranosido (44) y fenilpropoanoides glicosidados identificados como ternstrósidos A-F (45–50) (Tabla 3) (Jo, Kim, Shin, Chung, Jung y Im, 2006).

Las especies americanas también han sido estudiadas, *Ternstroemia pringlei*, es ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana para tratar los trastornos del sistema nervioso central (Linares, Flores y Bye, 1988; Frei, Baltisberger, Sticher y

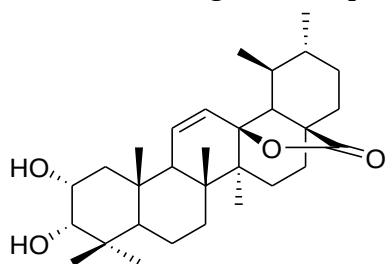
Heinrich, 1998.). El cáliz y los frutos de esta planta se comercializan bajo el nombre de “flores de tila”, y sus propiedades sedantes y antioxidantes se han demostrado en estudios utilizando extractos crudos (Balderas y Reza, 2008; Salgado y cols., 2015). Se ha comprobado la presencia de jacaranona (41) y ternstrósido B (45) en extractos metanólicos de la flor y hojas de *T. pringlei*. El efecto sedante y ansiolítico de la jacarana fue evaluado *in vitro* midiendo la liberación de GABA (ácido γ -aminobutírico) en cerebros de ratones, estableciendo que este compuesto tiene actividad sedante con una dosis efectiva 50 % (DE₅₀, dosis que produce el efecto deseado en el 50 % de la población) de 25 mg/Kg de peso del ratón, ninguno de los extractos evaluados presentó actividad ansiolítica. Este estudio valida el uso en la medicina tradicional de *Ternstroemia pringlei* como sedante (Lozada, Villarreal, Fliniaux, Bensaddek, Mesnard, Gutiérrez y Cardoso, 2010).

Otra especie que ha sido investigada es *T. sylvatica*, los estudios farmacológicos demostraron actividad sedante de los extractos de flores y frutos en modelos murinos (Aguilar y Tortoriello, 1996; Molina, Contreras, Téllez y Rodríguez, 1999). Recientemente, varios investigadores determinaron *in vivo* el efecto sedante y tóxico de los extractos acuosos de flores y frutos de esta planta, la actividad fue atribuida a la presencia de una saponina triterpénica identificada como 28-O- $[\beta$ -L-6-ramnopiranosil]-R₁-barrigenol (51) (Tabla 3), el efecto sedante se produjo a una DE₅₀= 0,12 mg/Kg y el tóxico a una dosis letal 50 % (DL₅₀, dosis letal para el 50 % de la población) de 1,11 mg/Kg, estos resultados sugieren que el efecto tóxico fue mayor que el sedante (Balderas y cols., 2013).

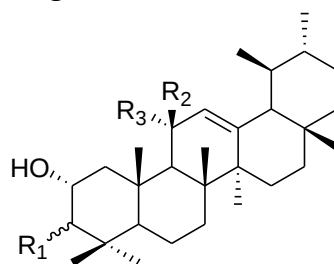
Adicionalmente, Moreno y cols (2017), evaluaron la actividad antiinflamatoria, analgésica y antioxidante de varios extractos (hexano, cloroformo, etanol) de las hojas de *T. sylvatica*. El extracto etanólico fue el más activo, presentó actividad antioxidante frente al radical difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) con una inhibición de 68,70 % y un contenido de polifenoles de 215,80 $\pm$ 8,50 meqAG/g. En la evaluación de la actividad antiinflamatoria produjo una inhibición de 56,34 % y 50,70 % a dosis de 250 y 500 mg/Kg de extracto, respectivamente durante la primera hora. En la

determinación de la actividad analgésica el mismo extracto mostró una inhibición del 30,60 % en el ensayo de contorsión con ácido acético. Los resultados obtenidos confirman que esta planta posee actividad antiinflamatoria y analgésica, sugiriendo que el mecanismo de acción probablemente está asociado al efecto antioxidante.

Tabla 3. Algunos compuestos obtenidos del género *Ternstroemia*



3-epi-acido-corosolico-lactona-(2 α ,3 α -dihidroxiurs-11-eno-13 β ,28-olido) (27)

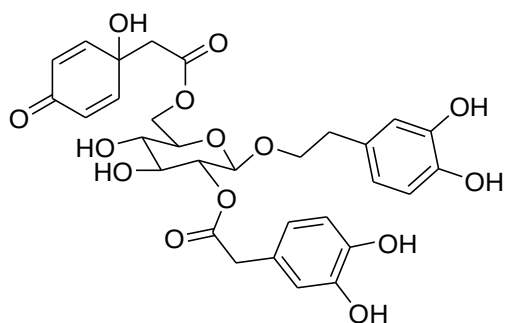


28 R₁= OH R₂=R₃ =O
29 R₁= OH R₂=R₃ =O
30 R₁= OH R₂= H R₃=OCH₃

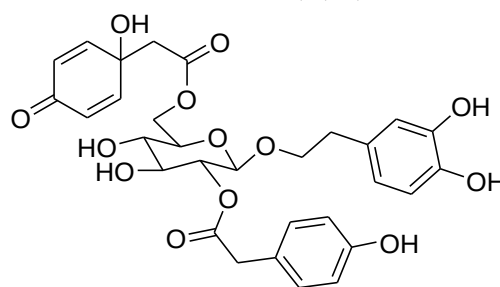
ácido 3-epi-ternstroem-(2 α ,3 α -dihidroxiurs-12-eno-11-ona-28-oico) (28)

ácido ternstroem-(2 α ,3 β -dihidroxiurs-12-eno-11-ona-28-oico) (29)

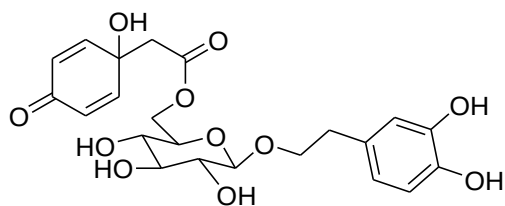
ácido gimnanter-(22 α ,3 α -dihidroxi-11 α -metoxiurs-12-eno-28-oico) (30)



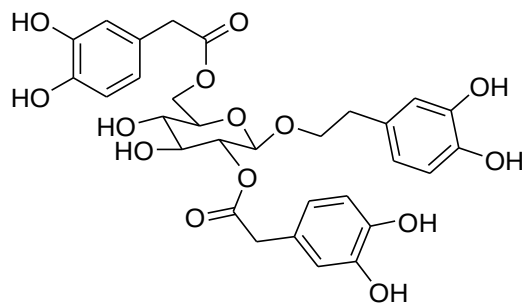
Terngimnosido A (31)



Terngimnosido B (32)

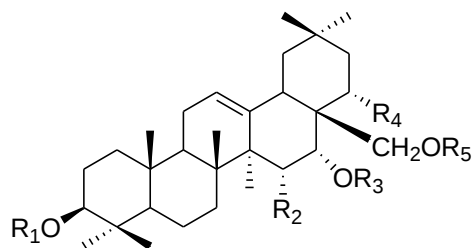


Terngimnosido C (33)



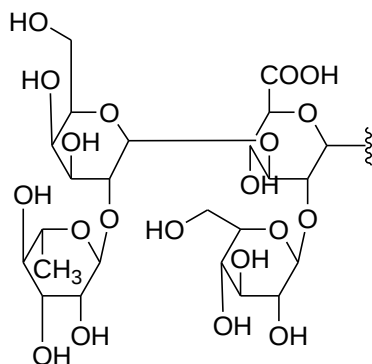
Terngimnosido D (34)

Tabla 3. Algunos compuestos obtenidos del género *Ternstroemia*

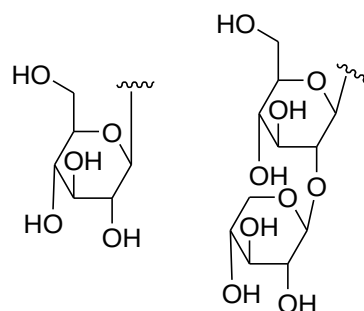


Ternstroemiósidos A-F (35-40)

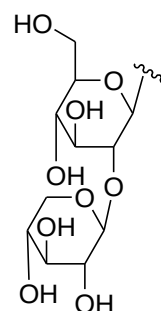
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
35	A	H	H	OH	H
36	A	H	Ac	OH	H
37	A	OH	H	H	H
38	A	OH	H	H	B
39	A	H	Ac	H	B
40	A	H	H	H	C



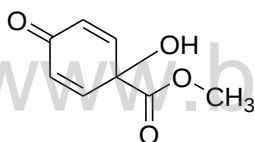
A



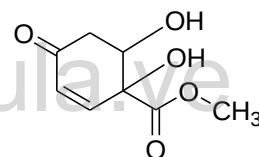
B



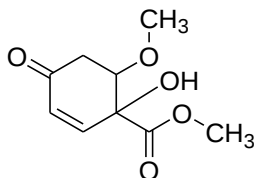
C



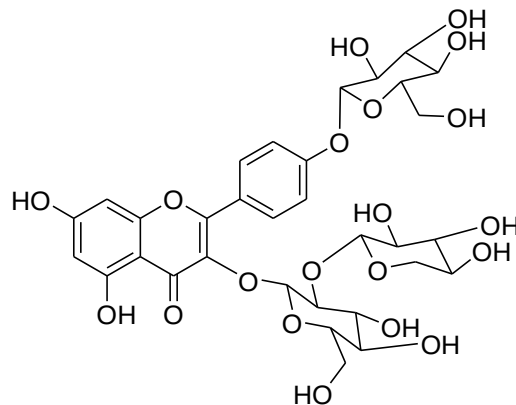
Jacaranona (**41**)



3-hidroxi-2,3-dihidrojacaranona (**42**)

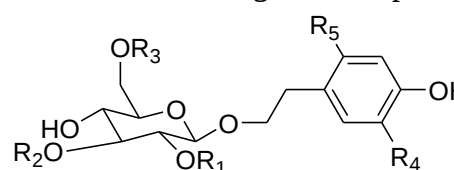


3-metoxi-2,3-dihidrojacaranona (**43**)

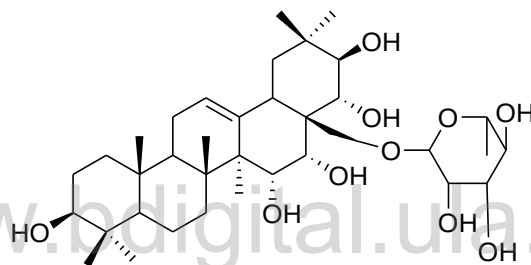
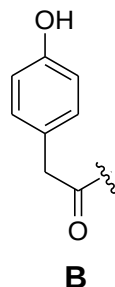
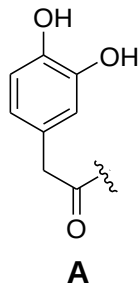


3-O- β -D-xilopiranosil-(1-2)- β -D-glucopiranosil-kaempferol-4'-O- β -D-glucopyranosido (**44**)

Tabla 3. Algunos compuestos obtenidos del género *Ternstroemia*

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	
	45	A	H	H	OH	H
	46	B	H	H	OH	H
	47	H	A	H	OH	H
	48	H	H	A	OH	H
	49	A	H	H	H	H
	50	A	H	H	OH	OH

Ternstrosidos A-F (45-50)



28-O-[β-L-6- ramnopiranosil]-R₁-barrigenol (**51**)

Ternstroemia delicatula

Esta planta se ha identificado en diferentes partes de Suramérica destacándose en Brasil, Guayana Francesa, Guyana, Trinidad y Surinam (Trópicos, 2014). Escasa en la selva tropical (Marion, Jansen y Lindeman, 1979). Según Lárez y Prada (2014), en su trabajo de investigación “Estado de conservación de algunas angiospermas en la planicie deltaica del estado Monagas, Venezuela”, el primer reporte de esta planta en Venezuela procede de un espécimen colectado en márgenes de la laguna Guasacónica. La única población observada de esta especie se localizó en un sector de dicha laguna muy próximo a la desembocadura del caño Temblador.

Según la revisión bibliohemerográfica realizada por las autoras de la actual investigación, hasta los momentos, no se encontraron publicaciones sobre la composición química y actividad biológica de *Ternstroemia delicatula*, por lo cual el presente estudio es considerado novedoso ya que brindará conocimientos científicos sobre la fitoquímica y actividad sedante de dicha especie, siendo un aporte de gran importancia para el género.

Productos Naturales

Las plantas aportan un sin número de compuestos químicos con actividad farmacológica, muchas veces comparable con otros fármacos utilizados en clínica. A lo largo de la historia la fitoterapia ha desarrollado diversos métodos de extracción para el mejor aprovechamiento de las virtudes terapéuticas de las plantas tratadas. El método de extracción utilizado depende del tipo de planta a emplear (caracteres organolépticos), de la concentración de principios activos y de sus propiedades farmacológicas. En general los productos naturales los podemos clasificar en: metabolitos primarios y secundarios (Tabla 4) (Marcano y Hasegawa, 2002):

Metabolitos primarios

La totalidad de las reacciones químicas que tienen lugar en las células de un ser vivo constituyen lo que se denomina metabolismo. Los procesos químicos que intervienen en forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas: la fotosíntesis, la respiración, el transporte de solutos, la translocación, la síntesis de proteínas, la asimilación de nutrientes, la diferenciación de tejidos, se conocen como metabolismo primario. Mediante estas reacciones se producen un gran número de compuestos orgánicos, incluyendo monosacáridos, aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos y sus polímeros derivados: polisacáridos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, y los compuestos que se producen se denominan metabolitos primarios (Concepción, 2010).

Metabolitos secundarios

El metabolismo secundario compromete aquellos procesos químicos que son únicos para una planta dada, y no son universales. Dicho metabolismo es la química que conduce a la formación de un metabolito secundario. Algunas porciones de esta química son comunes para un número de plantas diferentes o familias de plantas, pero actualmente la química de productos naturales es usualmente diferente de una planta a otra. Precursores químicos comunes pueden conducir a resultados diferentes. El metabolismo secundario no parece ser necesario para la supervivencia de las plantas, pero pueden suponer una ventaja competitiva considerable (Pomillo, 2012).

Los metabolitos secundarios son compuestos derivados del metabolismo primario, pero de limitada distribución en el reino de las plantas y restringidos a un grupo taxonómico particular. Los metabolitos secundarios no tienen una función aparente en el metabolismo primario, pero sí tienen una implicación ecológica como defensa contra herbívoros, virus, hongos, bacterias, como sustancias alelopáticas, fitoalexinas o disuasorios nutritivos. Otros tienen una función fisiológica, por ejemplo, los alcaloides, las pectinas que pueden servir para el transporte de nitrógeno tóxico y compuestos de almacenamiento, mientras los compuestos fenólicos como los flavonoides realizan una función como protectores de rayos ultravioletas. Además, son una fuente importante de principios activos de medicamentos y de valiosos productos químicos (Pérez y Jiménez, 2011).

Los compuestos secundarios de plantas de interés comercial, han sido incluidos en tres principales categorías según sus rutas biosintéticas: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados. Los terpenos se forman por la polimerización de unidades de isoprenos y esteroides, se dividen en seis grupos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y esteroides. Entre los compuestos fenólicos se incluyen los ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides y taninos. Los compuestos nitrogenados son principalmente los alcaloides y glucósidos cianogénicos. Los alcaloides son un diverso grupo de compuestos con cerca de 4 000 estructuras conocidas. Estos son fisiológicamente activos en humanos (cocaína,

nicotina, morfina) y por supuesto de gran interés en la industria farmacológica. Por otra parte, los glucósidos cianogénicos, se consideran posiblemente, los metabolitos secundarios con mayor relación en las funciones de defensa (Pérez y Jiménez, 2011). A continuación en la tabla 4 se plasman las diferencias entre los metabolitos primarios y secundarios:

Tabla 4. Diferencias entre metabolitos primarios y metabolitos secundarios

Metabolitos Primarios	Metabolitos Secundarios
Productos del metabolismo general	Productos del metabolismo especial.
Se encuentran distribuidos en plantas y microorganismos	Se biosintetizan a partir del metabolismo primario.
Indispensables para la vida	No indispensables para la vida
Distribución restringida a ciertas plantas, microorganismos	Distribución taxonómica restringida (a veces característico de una especie o género)
Aminoácidos de proteínas, monosacáridos, lípidos, ácidos derivados del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, glucósidos, etc.	Alcaloides, terpenos, flavonoides, esteroides, cumarinas, etc.

Tomado y modificado de Pérez y Jiménez, 2011.

Clasificación de los metabolitos secundarios en las plantas

Los metabolitos secundarios suelen ser agrupados según las sustancias químicas que le constituyen, estas pueden ser (Marcano y Hasegawa, 2002):

- **Compuestos fenólicos:** abarcan los ácidos fenólicos de 7 a 9 átomos de carbonos, tienen alto grado de polinización. Son sustancias que tienen un núcleo bencénico que soporta un grupo hidroxilo. Se suelen unir a azúcares para formar heterósidos pero también se pueden encontrar libres. Van desde sustancias muy simples, hasta muy complejas como las ligninas y taninos. Los grupos más importantes de este grupo son los ácidos fenólicos o fenoles, las cumarinas, los flavonoides, los lignanos, los taninos y las quinonas (Marcano y Hasegawa, 2002).
- **Terpenos:** Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isómeros, proceden de la condensación de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) un hidrocarburo de 5 átomos de carbono. De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isómeros. Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas, la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensa para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en el cloroplasto y genera también IPP. Se pueden encontrar en la fuente vegetal solos o formando glicósidos, son más frecuentes para triterpenos (Pérez y Ávalos, 2009).
- **Flavonoides:** Los flavonoides son sustancias sólidas cristalizadas de color blanco o amarillento. Son pigmentos vegetales que poseen un esqueleto carbonado. Es el nombre genérico de un grupo de moléculas generadas por el metabolismo secundario de los vegetales, que, como otros principios activos vegetales, se originan mediante una ruta biosintética mixta (en el caso de los flavonoides, a través de la ruta de los policétidos) (Bruneton, 2001). De forma general son moléculas con dos anillos bencénicos (ó aromáticos, para

químicos orgánicos) unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, algunos autores lo denominan compuestos C₆C₃C₆. Uno de los flavonoides más comunes: La quercetina (Marcano y Hasegawa, 2002).

- **Saponinas:** son heterósidos formados por una parte glucídica (con uno o más azúcares) y una genina (parte no glucídica) denominada sapogenina, que puede ser de naturaleza esteroide o triterpénica, de carácter poco polar. Los azúcares más frecuentes constituyentes de los dos tipos de saponósidos son: glucosa, arabinosa, ramnosa, galactosa y xilosa, y en los saponósidos triterpénicos es frecuente el ácido glucurónico. Los saponósidos se caracterizan por su capacidad de producir espuma cuando se agita cualquier solución acuosa que los contenga. La espuma que se forma disminuye la tensión superficial del agua, son tensoactivos naturales (Marcano y Hasegawa, 2002).
- **Alcaloides:** constituye grupos heterógenos de base vegetal nitrogenada, estos se hallan en los vegetales como sales de ácidos orgánicos. Pertenecen a este grupo, entre otras, sustancias como la morfina, la heroína y la cocaína. El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre pared celular y el ADN del microorganismo (Marcano, y Hasegawa, 2002).

Bioactividad de un fitoquímico

En general, los efectos fisiológicos de un alimento vegetal completo son superiores a los que tienen cada uno de los compuestos individuales, las dudas surgen a la hora de conocer cuáles son los fitoquímicos o combinaciones de ellos que tienen una acción preventiva sobre los humanos. Sin embargo, se sabe que ciertos compuestos aportan beneficios específicos sobre la salud y en particular algunos poseen propiedades antioxidantes que protegen frente a los efectos del envejecimiento y de algunas enfermedades crónicas, tales como el cáncer y las cardiovasculares. Estos compuestos bioactivos incluyen: carotenoides fenólicos, tales como flavonoides y

catequinas, fitoestrógenos, como isoflavones y lignanos, glucosinolatos, fitoesteroides, terpenoides y saponinas. Para la mayoría de los fitoquímicos, todavía no se conocen bien sus bases moleculares, ni sus interacciones con otros componentes dietéticos (Pérez y Jiménez, 2011).

Las aplicaciones farmacéuticas de estos compuestos son considerables, se refieren sus efectos como analgésicos, antibacterianos, antihepatotóxicos, antioxidantes, antitumorales, inmunoestimulantes, antifúngicos, anticonvulsivos y sedantes. Asimismo, las propiedades de la mayor parte de las especias, condimentos, infusiones y bebidas como el café, el té y el chocolate, aromas, saborizantes y estimulantes se les atribuyen a metabolitos secundarios farmacológicamente activos, como los alcaloides cafeína, teofilina y teobromina (Pérez y Jiménez, 2011).

Extractos Vegetales

La separación de un compuesto por extracción se basa en la transferencia selectiva del compuesto desde una mezcla sólida o líquida con otros compuestos hacia una fase líquida (normalmente un disolvente orgánico). El éxito de la técnica depende básicamente de la diferencia de solubilidad en el disolvente de extracción entre el compuesto deseado y los otros compuestos presentes en la mezcla inicial (Azuola y Vargas, 2007).

Los principales activos contenidos en las plantas pueden ser extraídos mediante diversas técnicas extractivas, a lo largo de la historia la fitoterapia ha desarrollado diversos métodos de extracción para el mejor aprovechamiento de las virtudes terapéuticas de las plantas. El método de extracción utilizado depende del tipo de planta a emplear, de la concentración de principios activos y de sus propiedades farmacológicas, los métodos más utilizados son (Rivas, Oranday y Verde, 2016):

Maceración: El material crudo previamente triturado se pone en contacto duradero con cantidad suficiente de solvente, en un tanque cerrado a temperatura ambiente durante 2-14 días hasta agotamiento de la droga vegetal. Puede utilizarse

agitación. Posterior a este tiempo la mezcla es filtrada, el material insoluble es lavado con el mismo solvente y los filtrados se mezclan para concentrar el extracto (Valcarcel y Gómez, 1988).

Percolación o lixiviación: El material crudo previamente triturado se pone en contacto con cantidad suficiente de solvente se renueva de modo continuo manteniéndose un gradiente de concentración, el disolvente puro desplaza al que contiene la sustancia extraída sin ser necesario aplicar presión. La droga residual es prensada y el fluido obtenido es combinado con el percolado para concentrar el extracto (Valcarcel y Gómez, 1988).

Soxhlet: El proceso de extracción por el método Soxhlet se realiza de manera continua de un material sólido que contiene distintos compuestos deseados, se coloca dentro de un dedal de papel filtro grueso, que se carga en la cámara principal del extractor Soxhlet, donde se hace pasar el solvente, este ciclo puede repetirse muchas veces, durante un periodo de horas o días (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

Arrastre por vapor: se utiliza principalmente para aceites esenciales. Los aceites esenciales (AE) contienen compuestos orgánicos volátiles o aromáticos, que pueden ser alcoholes, cetonas, éteres, aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas. Se les extrae preferentemente por arrastre de vapor mediante el uso de vapor saturado a presión atmosférica (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico o *screening* fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Por lo tanto, consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe de permitir la evaluación

rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo (Sharapin, Machado, Souza, Rocha, Valverde y López, 2000).

Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico. Así cuando una planta revela acción sobre el sistema nervioso central durante el tamizaje farmacológico y presencia de alcaloides en el tamizaje fitoquímico, es bastante probable que la acción farmacológica se deba a la fracción alcaloidal (Sharapin y cols., 2000).

De la misma manera, el hecho de evidenciarse acción antiinflamatoria en el tamizaje farmacológico y la presencia de flavonoides en el tamizaje fitoquímico, puede dar lugar a procesos de aislamiento y sometimiento a pruebas más específicas de estos compuestos. Efectos catárticos pueden ser asociados a las antraquinonas. La presencia de glicósidos cianogénicos durante la marcha fitoquímica puede dar lugar al escarte de la planta por su alta toxicidad (Sharapin y cols., 2000).

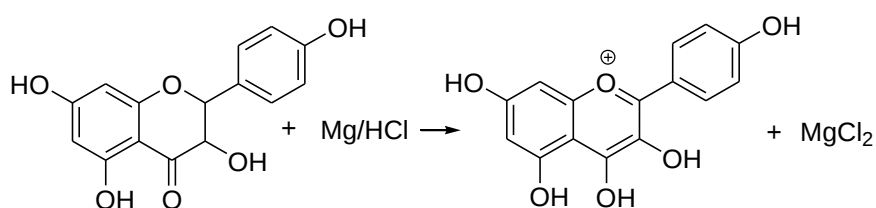
De acuerdo a lo anteriormente expuesto, a continuación se mencionan los fundamentos en los cuales se basan las principales pruebas químicas que se realizan para determinar algunos metabolitos secundarios de origen vegetal (Rivas, Oranday y Verde, 2016):

Ensayo de Dragendorff y Wagner: estas pruebas permiten reconocer en un extracto la presencia de alcaloides. Con el reactivo de Dragendorff se determina la presencia de alcaloides y aminor terciarias, los alcaloides se detectan por la formación de un precipitado naranja rojizo cuando se le adiciona el reactivo a una solución ácida de alcaloides. Este precipitado es un compuesto de coordinación que está formado por tres moléculas de alcaloides en coordinación electrostática con el bismuto del reactivo de Dragendorff. En el ensayo de Wagner parte del iodo-ioduro de potasio, reacciona con el alcaloide para formar el ioduro doble de alcaloide dando como resultado positivo un precipitado color café (Rengifo, 2013).

Ensayo de Shinoda: permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal, estos metabolitos secundarios al ser tratados con Mg y HCl dan

complejos coloreados que dependen de la estructura del flavonoide presente, el Mg metálico es oxidado por el HCl, dando como productos H_2 que es eliminado en forma de gas y el $MgCl_2$, que es el que forma complejos con los flavonoides dando coloraciones características (Figura 2), anaranjado para flavonas, rojo para dihidroflavonas, rojo azulado para flavonoles, violeta para dihidroflavonoles y xantonas (Rengifo, 2013).

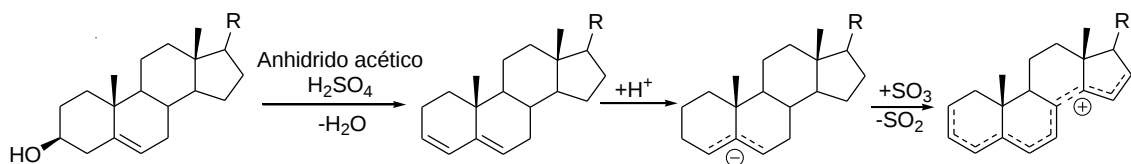
Figura 2. Fundamento químico de la reacción de Shinoda



Tomado y modificado de Clavijo y Cruz, 2017.

Ensayo de Liebermann-Buchard: permite reconocer la presencia de triterpenos y/o esteroides. Esta prueba utiliza una mezcla compuesta de ácido sulfúrico y anhídrido acético que producen sustancias cromóforas con el ciclopentano perhidrofenantreno, por el incremento de los dos dobles enlaces conjugados formados por la deshidratación e isomerizaciones en los terpenos y esteroides (Figura 3). Se considera positiva la prueba cuando aparecen coloraciones roja o verde (Domínguez, 1979).

Figura 3. Fundamento químico de la reacción de Lieberman-Bourchard

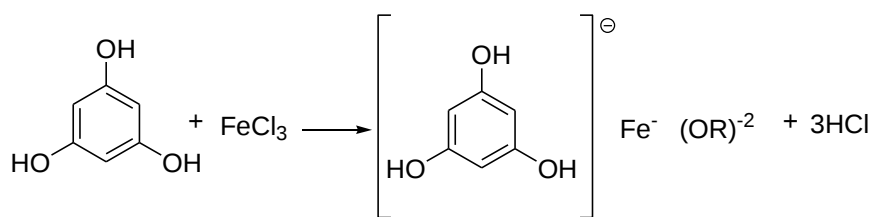


Tomado y modificado de Clavijo y Cruz, 2017.

Ensayo de cloruro férrico: permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con

alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. Los fenoles dan prueba positiva en presencia de una solución de FeCl_3 , al cambiar el color de este que es amarillo-naranja a verde, violeta o pardo. El ion cloruro ataca al hidrogeno del grupo hidróxido provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al Fe (formación de un complejo) (Figura 4) (Marcano y Hasegawa, 2002).

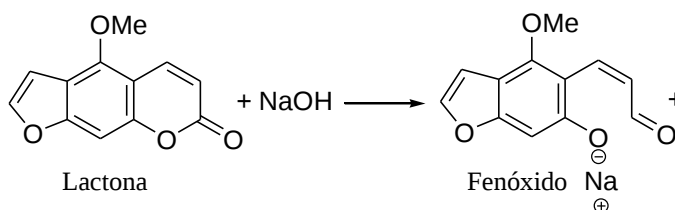
Figura 4. Fundamento químico de la Reacción con FeCl_3



Tomado y modificado de Clavijo y Cruz, 2017.

Ensayo de Baljet: es útil para reconocer la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar resultado positivo. Esta reacción se basa en la apertura y solubilización en medio básico (Figura 5). Las cumarinas se caracterizan por su intensa absorción de la región UV del espectro, las cuales al ser examinadas a la luz ultravioleta presenta coloración exaltada en presencia de amoníaco (Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011).

Figura 5. Fundamento químico del ensayo de Baljet



Tomado y modificado de Tamayo y cols., 2011.

Ensayo de Borntrager: es útil para detectar la presencia de quinonas. La naftoquinonas y antraquinonas libres al ser tratadas con la solución de hidróxido

amónico forman complejos de color rojo cereza. Esta reacción es utilizada para la detección directa de quinonas en los extractos vegetales (Tamayo y cols., 2011).

Ensayo de espuma: permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroideal como triterpénica, la característica estructural de estos compuestos les confiere un carácter anfótero que les permite actuar como tensioactivos y forman espuma que es estable por lo menos 30 minutos (Carvajal, Uribe, Sierra y Rueda, 2009).

Prueba de gelatina al 1 %: permite reconocer taninos, estos compuestos son polímeros de poli fenólicos con la propiedad de desnaturalizar las proteínas de la solución de gelatina produciendo un precipitado (González, 2011).

Aspectos Generales del Sueño

El sueño es mucho más que un simple acto de “suspensión de los sentidos y de todo movimiento” como lo define la Real Academia de la Lengua Española en 2001 (REA, 2001). Es un proceso fisiológico que se da en los mamíferos y otras especies, que consiste en una etapa de relativa inactividad física durante la cual ocurre una serie de procesos neuroendocrinos, cardiovasculares, respiratorios, gastrointestinales y variaciones en la temperatura, a la vez que la persona durmiente lo percibe como un proceso de descanso y recuperación. Además, está comprobado que el sueño tiene una relación importante con la consolidación de la memoria y, por lo tanto, tiene efectos en el aprendizaje (Hobson y Pace-Schott, 2002). El sueño se acompaña de un umbral sensorial elevado y de cambios específicos en el electroencefalograma que varían con la profundidad del mismo, incluye conductas para su realización tales como asumir una posición específica de reposo y eliminar estímulos en el ambiente, entre otros (Datta, 2010).

Aún no se tiene una idea clara acerca de por qué dormimos, además es poco probable que exista sólo una respuesta para esta pregunta, sin embargo, sí resulta evidente que diversos y muy importantes procesos fisiológicos, están estrechamente relacionados o incluso están determinados por el sueño o la periodicidad del mismo

(Vassalli y Dijk, 2009; Diekelmann y Born, 2010). A este respecto, existen diversas teorías acerca de las funciones del sueño, por ejemplo:

- Restablecimiento o conservación de la energía.
- Eliminación de radicales libres acumulados durante el día.
- Regulación y restauración de la actividad eléctrica cortical.
- Regulación térmica.
- Regulación metabólica y endocrina.
- Homeostasis sináptica.
- Activación inmunológica.
- Consolidación de la memoria, etc.

Aun cuando algunos autores definen el sueño como un estado conductual, generalmente espontáneo que precisa de un ambiente y postura adecuados y genera cambios electroencefalográficos que lo diferencian de la vigilia. En el sueño se pueden diferenciar distintos grados de profundidad basándose en diferentes variables fisiológicas que cambian en sus diferentes etapas. Los llamados indicadores del sueño son: el electroencefalograma (EEG) los movimientos oculares y el tono muscular. Mediante los estudios de polisomnografía se estudian dichos indicadores y se diferencian las distintas fases del sueño (Diekelmann y Born, 2010).

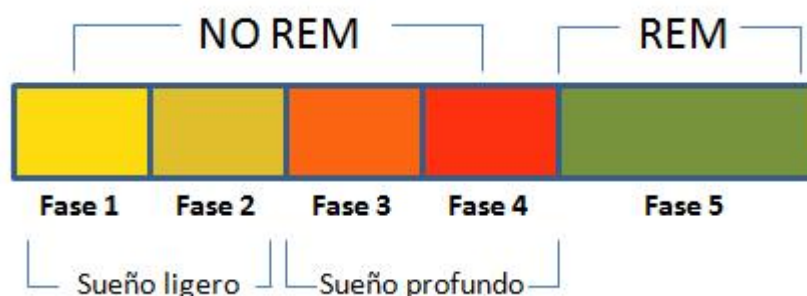
Fases del sueño

El sueño fisiológico tiene una estructura específica, que se caracteriza por la sucesión de 4 o 5 ciclos de 90 a 120 minutos cada uno. Un ciclo se compone, en función de las ondas rítmicas emitidas por el cerebro, de 5 fases de duración desigual. Las fases comprendidas entre la I y la IV corresponden al sueño lento y la fase V corresponde al sueño rápido. La etapa más profunda es el sueño rápido o REM (rapid eye movement), también llamado paradójico, que presenta una actividad EEG similar a la del estado de vigilia, hipotonía muscular y movimientos oculares rápidos (Talero, Durán y Pérez, 2013).

Durante el sueño REM se produce estimulación de los órganos sexuales y se desarrollan los sueños. El sueño lento o NREM (non rapid eye movement), con diversos escalones (fases de I a IV), presenta un enlentecimiento progresivo del EEG, pero persiste el tono muscular. Se estima que la fase REM del sueño ocupa, en término medio en una persona adulta sana, un 20-25 % del total del sueño. Al final de la fase V la persona dormida ha cerrado un ciclo. A partir de aquí puede aparecer otra fase I, dando comienzo al ciclo siguiente. Las diferentes fases del sueño tienen una duración variable, en función del ciclo durante el cual se desarrollan. Con la edad se observan cambios en la duración total de sueño, el tiempo de sueño NREM y el sueño REM (Talero y cols., 2013).

Por otra parte, el tiempo de sueño total es más elevado en la infancia, disminuyendo progresivamente y alcanzando una media de 7-9 horas a los 18 años, que se mantiene hasta los 60-65, en que comienza a disminuir (Llados, 1998). Los estudios sobre la fisiología del sueño han avanzado de forma muy importante en los últimos años basándose en las nuevas tecnologías de neuroimagen, entre otras. Las características fisiológicas de la actividad onírica varían a lo largo de las distintas etapas del sueño. Durante el sueño REM aparecen imágenes más raras y estrafalarias, los reportes de los sueños son más largos, más emocionales que en las etapas NREM lo que correlaciona con la diferente fisiología de estas fase (Figura 6) (García, 2013).

Figura 6. Fases del sueño tipo REM y NO REM



Tomado y modificado de Bonilla, 2013.

Ritmos circadianos

Los ritmos biológicos se refieren a la periodicidad de ocurrencia de diferentes tipos de eventos, desde aquellos de tipo bioquímico al interior de la célula, hasta procesos adaptativos que constituyen actividades importantes para el mantenimiento del equilibrio homeostático del organismo. Aquellos ciclos que ocurren en periodos inferiores a las 24 horas como, por ejemplo, los ciclos relacionados con la alimentación se denominan ciclos ultradianos, los que se cumplen en periodos mayores a 24 horas y que incluso involucran semanas se denominan ciclos infradianos. El ciclo circadiano que incluye un ciclo de luz y oscuridad de 24 horas está relacionada íntimamente con el sueño y la vigilia. Es una característica de los seres vivos desde estadios celulares simples que muestran actividad cíclica hasta mamíferos entre los cuales están los humanos. Este ritmo está controlado por relojes biológicos internos que son independientes de contingencias externas como los cambios de temperatura (Reddy y O'Neill, 2010).

Los relojes biológicos que controlan el ritmo circadiano están relacionados con el centro principal de regulación de los ritmos circadianos que es el núcleo supraquiasmático (NSQ), quien además interviene la actividad de los diferentes sistemas de neurotransmisores, con aspectos metabólicos y del sistema nervioso vegetativo, así como con el control de temperatura y la actividad neuroendocrina (Hastings, O'Neill, y Maywood, 2007).

Neurobiología del sueño

Las estructuras anatómicas que intervienen en la regulación del ciclo vigilia-sueño forman una red neuronal compleja que se halla interconectada entre sí con el Sistema Nervioso Central (SNC) este consta del encéfalo y la médula espinal, que contienen los cuerpos de la mayor parte de las neuronas que constituyen el tejido nervioso. La información sensorial llega al SNC a través de los sentidos especiales y de los nervios periféricos y es integrada con las memorias y los estados de ánimo con

el fin de generar respuestas cognitivas, emocionales y motoras (conductuales). Este procesamiento sucede debido a una interacción de neurotransmisores y neuromoduladores que actúan sobre sus receptores para excitar o inhibir a las neuronas del SNC (Brenner y Stevens, 2018).

En el mecanismo de interconexión neuronal vehiculado por las sinapsis es imprescindible la liberación de unas sustancias químicas llamadas neurotransmisores. Estas son sustancias químicas o biomolécula, llamados también mensajeros químicos, cuya principal función es la transmisión de información de una neurona a otra atravesando el espacio sináptico que separa dos neuronas consecutivas, afectándola de forma específica; su acción inicia al ser liberado en la extremidad de una neurona, mientras se desarrolla la propagación del impulso nervioso, fijándose en los puntos precisos de la membrana de la neurona siguiente (Carlson, 2008).

Estas biomoléculas deben cumplir con los siguientes criterios:

- Se sintetiza en la neurona.
- Está presente en la neurona presináptica.
- Se libera en cantidad suficiente para producir un efecto postsináptico.
- Produce el mismo efecto si se libera de forma natural (endógena) o si se aplica como fármaco (exógena).
- En condiciones de reposo, se encuentra almacenado en vesículas en el botón sináptico.

Actualmente se han descubierto muchos tipos de neurotransmisores, aunque en general existen tres categorías (Shepherd, 1984):

- 1) Los transmisores aminoácidos que incluyen glutamato, GABA, glicina y aspartato.
- 2) Las monoaminas norepinefrina y dopamina (catecolaminas) y serotonina (indoleamina) son derivados de aminoácidos.

- 3) Los neurotransmisores péptidos (cadenas de aminoácidos) de moléculas grandes, generalmente se sintetizan en el soma y se transportan a lo largo de los axones hasta los botones terminales.

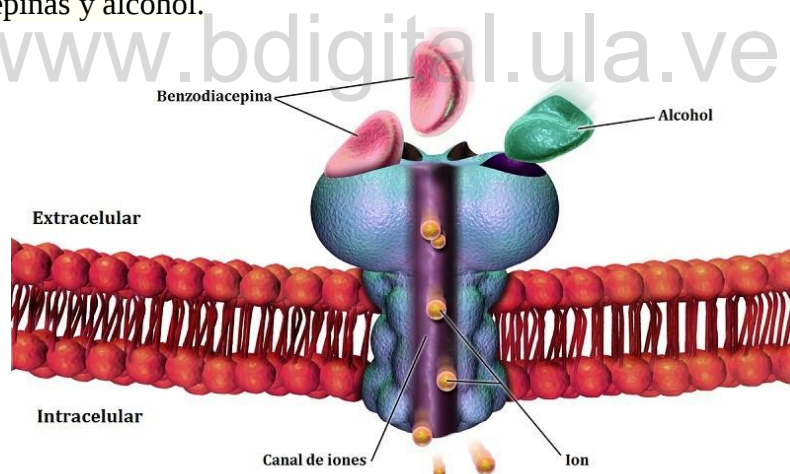
Existen distintas regiones del cerebro donde se ubican zonas para neurotransmisores específicos, así como otras regiones o “áreas de proyección” en las que los axones de los somas se proyectan hacia éstas y donde en última instancia se liberan neurotransmisores, esto permite que ciertas zonas del cerebro desempeñen funciones específicas. El efecto del neurotransmisor puede ser de excitación, si despolariza la membrana, o inhibitorio, si la repolariza. Dentro del primer grupo, o excitatorios, se encuentran las catecolaminas (dopamina, adrenalina y noradrenalina), la serotonina, el glutamato y el aspartato; mientras que entre los inhibidores destacan el GABA (ácido gamma-amino-butírico) y las endorfinas. El delicado balance entre el tono excitador y el inhibidor en una compleja red neuronal permite el funcionamiento armónico del organismo (Purves, Augustine, Fitzpatrick, Katz, LaMantia y McNamara, 2004).

El ácido γ amino-butírico (GABA)

Es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC; es reconocido por tres tipos de receptores, GABA_A, GABA_B y GABA_C los cuales ejercen efectos inhibitorios sobre el SNC (Bowery, Doble y Hill, 1981). Los receptores GABA_A y GABA_C se conocen como receptores ionotrópicos y básicamente son unidades pentaméricas (formadas por cinco subunidades de naturaleza proteica), que forman un canal iónico selectivo para el ion cloro. Mientras que, los receptores GABA_B son receptores transmembranales de siete dominios acoplados a proteínas G y sistemas de segundos mensajeros que activan canales de Ca²⁺ y K⁺, los cuales son conocidos como receptores metabotrópicos (Bormann, 2000).

Las células GABAérgicas encargadas de secretar el GABA se encuentran distribuidas a lo largo del SNC como en médula espinal, cerebelo, ganglios basales y otras áreas de la corteza cerebral (Enna y Möhler, 2007). Este neurotransmisor activa al receptor al unirse a su sitio de reconocimiento, y frecuencia o tiempo de apertura del canal puede ser modificado por activación de sitios de reconocimiento específicos para benzodiacepinas, barbitúricos, alcohol o neuroesteroides (Möhler, Benke, Benson, Lüscher, Rudolph y Fritschy, 1996). La activación de un receptor GABA_A incrementa la concentración intraneuronal de iones Cl⁻ hiperpolarizando a la neurona. La sensibilidad y actividad de los receptores GABA_A está modulada por la afinidad de ciertos fármacos sobre sus sitios de unión y reconocimiento de las subunidades que lo conforman, ya sea de forma individual o en combinación ver Figura 7 (Klein, Mascia y Harkness, 1995).

Figura 7. Representación de la estructura del receptor GABA_A y sitios de unión a benzodiacepinas y alcohol.



Tomado y modificado de Belelli y Lambert, 2005.

La importancia de conocer las características moleculares de los sitios de reconocimiento del receptor, radica en activación de los receptores GABAérgicos a nivel central señala su participación directa o indirecta sobre la regulación de algunos desórdenes de las funciones cerebrales, tales como los trastornos de ansiedad, sueño, crisis de pánico, *status* epilépticos y desórdenes a nivel cognitivo. Por este motivo, las

terapias farmacológicas empleadas en la actualidad para el control de estos padecimientos tienen como blanco terapéutico algún tipo de receptor GABAérgico (Medel, Cortijo, Gasca, Susan, Pérez y Ramos, 2011).

Trastornos primarios del sueño

La clasificación internacional de los trastornos del sueño considera el insomnio como una disomnia. Las disomnias son aquellos trastornos del sueño en los que está alterada la cantidad y la calidad del sueño (Thorpy, 1990). Incluye el insomnio, la hipersomnia y los trastornos del ritmo de sueño vigilia. Las parasomnias son trastornos que se dan durante el sueño sin una significación patológica relevante y que son más frecuentes durante la infancia, desapareciendo con la edad. Cuando persisten en la vida adulta implican alguna patología psiquiátrica (generalmente trastornos de ansiedad y de personalidad). Algunos de ellos son el sonambulismo, los terrores nocturnos y las pesadillas (Sarrais y De Castro, 2007).

Con frecuencia las alteraciones del sueño son un síntoma de otro trastorno mental o somático. Incluso cuando un trastorno específico del sueño aparece aislado puede ser una secuela de un trastorno psíquico o somático anterior. De las disomnias vamos a exponer con detalle aquellos trastornos que cursan propiamente con insomnio (Sarrais y De Castro, 2007).

La mayoría de los casos de insomnio tienen un inicio agudo, coincidiendo con situaciones de estrés, y en el 60 % de los casos se convierten en crónicos debido a factores comportamentales y cognitivos desarrollados tras el episodio agudo de insomnio, dando lugar al denominado insomnio condicionado, o también llamado psicofisiológico. Estos pacientes presentan una preocupación excesiva por dormir, importante empeño en iniciar el sueño lo antes posible, pueden dormir fácilmente fuera de la cama y duermen bien fuera de casa (Bobes, 1992).

Insomnio

El insomnio se caracteriza por la perturbación de la calidad o de la cantidad de sueño lo que provoca la ausencia involuntaria de descanso reparador. La consecuencia de la falta de un buen descanso nocturno es la aparición de diversos trastornos durante la actividad diurna tales como sensación de fatiga, disforia, ansiedad, falta de energía y disminución del nivel de alerta conductual. La aparición de episodios de insomnio es extremadamente frecuente entre la población adulta siendo más frecuente en el sexo femenino y entre los ancianos. Los cuadros prolongados o permanentes de insomnio son bastante menos comunes (Sarrais y De Castro, 2007).

Tipos de insomnio

La clasificación más sencilla es la que distingue entre insomnio primario y secundario. Según ésta, la mayoría de las veces el insomnio es una manifestación secundaria de una causa subyacente, y sólo en un pequeño porcentaje de los casos (10-20 %) puede ser catalogado como trastorno primario del sueño, en el que no puede detectarse ninguna patología médica o causa psicológica que lo pueda justificar (Sarrais y De Castro, 2007). Por otro lado, en función del momento del sueño en el que se presente el insomnio, se puede clasificar en:

- Insomnio inicial o de primera hora: es la dificultad para conciliar el sueño, a menudo, este tipo de insomnio se debe a un estado de hipervigilia o a un estado de ansiedad ligada a causas exógenas.
- Insomnio medio o de sueño interrumpido: aquel que se presenta con despertares frecuentes durante la noche con dificultad para continuar el sueño. Puede tener relación con una ansiedad aguda o con un estado depresivo camuflado.

- Insomnio terminal o de segunda hora: se presenta con un despertar demasiado pronto por la mañana, sin posibilidad de conciliar el sueño de nuevo; suele estar ligado a menudo a la ingestión excesiva de somníferos.

Otra clasificación a tener en cuenta es la que distingue los diferentes tipos de insomnio en función de la duración de los síntomas (Fernández e Iglesias, 1997). Según este criterio se distingue:

- Insomnio transitorio (2-3 días).
- Insomnio a corto plazo (3 días- 3 semanas).
- Insomnio a largo plazo o crónico (> 3 semanas).

El insomnio transitorio y el insomnio a corto plazo están relacionados con un factor de estrés agudo, como podrían ser problemas laborales, emocionales, cambios de turno de trabajo, viajes transoceánicos, etc. Sin embargo, el insomnio a largo plazo exige un estudio de los posibles factores etiológicos, entre los que se podrían encontrar: causas de origen psiquiátrico como depresión, ansiedad, crisis psicóticas y anorexia; causas toxicológicas siendo las más comunes el consumo de alcohol, tabaco, estimulantes del sistema nervioso central (SNC) como son la cafeína, y anfetaminas; siendo, en general, los simpaticomiméticos o agonistas adrenérgicos, que van desde simples descongestivos nasales hasta broncodilatadores. Además, existen otras muchas posibles causas de insomnio crónico, aunque minoritarias dentro de estas podemos mencionar: distrés respiratorio, mioclonía nocturna, etc (Fernández e Iglesias, 1997).

Trastornos secundarios del sueño

- *Insomnio asociado a enfermedades neurológicas*

La epilepsia se acompaña de un aumento de la latencia del sueño, del número y la duración de los despertares, de la duración de las fases 1 y 2 del sueño, y de una disminución o fragmentación del sueño REM. En la enfermedad de Parkinson las

alteraciones más frecuentes son un aumento de la latencia del sueño, fragmentación del sueño, despertares frecuentes y un periodo de vigilia nocturna de un 40 % de la noche. Estos trastornos del sueño aparecen en un 75 % de los pacientes de estos pacientes. En las demencias se produce también un incremento de la latencia del sueño y del número de despertares. En la enfermedad de Alzheimer, a medida que se agrava, el ritmo circadiano pierde su ritmicidad y se hace polifásico dando lugar al llamado síndrome del anochecer o fenómenos de la puesta de sol (episodios de confusión vespertinos) acompañados de un incremento de la vigilia durante la noche e hipersomnia diurna (Sarrais y De Castro, 2007).

- *Insomnio asociado a enfermedades psiquiátricas*

El insomnio acompaña a la casi totalidad de las enfermedades psiquiátricas, aproximadamente alrededor de un 40 % de los pacientes con insomnio presentan un trastorno psiquiátrico (Buysee, Kales, Reynolds, Kupfer, Thorpy, Bixler, Manfredi, Vgontzas, Stepanski, Roth, Haiti y Mesiano, 1994). Teniendo el 30 % de los casos una depresión (Ringdahl, Pereira y Delzell, 2004) y entre el 10 al 15 % de los casos abuso de sustancias (Meyer, 1998).

- *Insomnio asociado a otras enfermedades médicas*

Suelen producir algún tipo de insomnio aquellas enfermedades que se acompañan de dolor y malestar físico intenso, como trastornos cardiovasculares (insuficiencia cardíaca), digestivos (úlceras, hernia de hiato, etc.), respiratorios (asma, EPOC, síndrome de apneas del sueño), renales (insuficiencia renal crónica, cólicos nefríticos), enfermedades osteoarticulares, alérgicas, infecciosas, oncológicas, urológicas (hipertrofia benigna de próstata) (Ancoli, 2000).

También se acompañan de alteraciones del sueño algunas situaciones fisiológicas y cambios hormonales que afectan a la mujer en el postparto o perimenopausia, y la toma de algunas medicaciones como el beta-agonista, corticosteroides, diuréticos, antidepresivos, descongestionantes, antihistamínicos, betabloqueantes, etc (Ancoli, 2000).

Tratamiento del Insomnio

El tratamiento del insomnio debe basarse en su origen, su severidad y su duración. Debido a que la mayoría de los insomnios son secundarios a alguna enfermedad, la clave de su tratamiento está en resolver dicha causa. Mientras se trata la causa se puede mejorar el sueño con medidas psicológicas y farmacológicas (Ringdahl, Pereira y Delzell, 2004).

Tratamiento no farmacológico

El tratamiento no farmacológico tiene algunas ventajas con respecto al farmacológico: es más económico, presenta menos efectos secundarios, el paciente es protagonista activo de su mejoría y a largo plazo cuando es eficaz, tiene menos riesgo de recaídas. Tiene el inconveniente de ser más difícil de poner en práctica ya que requiere cambios en los hábitos de vida arraigados a veces, exigen mayor dedicación por parte de los médicos y son pocos los terapeutas que dominan estas técnicas; es más sencillo y efectivo a corto plazo prescribir un hipnótico que persuadir al paciente de lo beneficiosos que son a largo plazo los cambios de hábitos (Ringdahl, Pereira y Delzell, 2004). En muchas ocasiones conviene apoyarse temporalmente en los fármacos mientras se enseña a poner en práctica el tratamiento conductual escogido, de hecho los mejores resultados se han obtenido con la aplicación conjunta del tratamiento de plantas medicinales junto a las medidas psicológicas (Simón y Vonkorff, 1997).

Tratamiento farmacológico

- *Hipnóticos y sedantes (Depresores del SNC)*

Los hipnóticos y sedantes son depresores no selectivos o generales del SNC; se emplean para reducir la inquietud, la tensión emocional y para provocar sueño o el reposo. La sedación puede definirse como una disminución en la reactividad o capacidad de respuesta a un nivel constante de estimulación con el descenso en actividad e ideación espontáneas. Las reacciones adversas más comunes son la

somnolencia, el letargo y el ahogo. La sobredosis da lugar a coma e incluso a la muerte producida por depresión de los centros vitales modulares del cerebro. El uso prolongado, incluso a dosis terapéutica, puede producir dependencia psíquica y física. La interrupción repentina de la medicación provoca a veces un grave síndrome de abstinencia caracterizado por convulsiones y delirio; puede producir coma y la muerte (Korolkovas y Burckhalter, 1983).

Muchos fármacos deprimen la función del SNC y generan calma o somnolencia (sedación). Un sedante disminuye la actividad, modera la excitación y calma al receptor, en tanto que un hipnótico genera somnolencia y facilita el inicio y la conservación del estado del dormir (sueño) que se asemeja en sus características electroencefalográficas al sueño natural, y del cual es posible despertar fácilmente al receptor. La sedación es un efecto adverso de muchos fármacos que no son depresores generales del SNC como los antihistamínicos y los antipsicóticos (Brunton, Lazo y Parker, 2006).

La mayoría de los depresores del SNC actúan aumentando la actividad del ácido γ -amino-butírico (GABA), una sustancia química que inhibe la actividad cerebral. Esto causa los efectos de sedación y de somnolencia que hacen que el medicamento resulte eficaz para tratar la ansiedad y los trastornos del sueño. Las personas que comienzan a tomar depresores del SNC por lo general se sienten somnolientas y faltas de coordinación los primeros días hasta que el organismo se ajusta a esos efectos secundarios. Otros efectos causados por el consumo y el abuso de estos medicamentos pueden incluir (Valdivielso, 1998):

- Habla distorsionada
- Poca concentración
- Confusión
- Dolor de cabeza
- Vahídos
- Mareos
- Sequedad en la boca
- Problemas motrices y de memoria

- Disminución de la presión arterial
- Respiración lenta

Si una persona toma depresores del SNC durante mucho tiempo, es posible que necesite dosis mayores para lograr efectos terapéuticos. El consumo continuo también puede llevar a la dependencia y a síntomas de abstinencia cuando se reduce abruptamente la cantidad del medicamento o se deja de tomar por completo. La interrupción repentina del consumo también puede causar consecuencias perjudiciales, como convulsiones (Valdivielso, 1998).

Los sedantes constituyen un amplio grupo de fármacos que se emplean para mejorar la tolerancia ambiental, preservando la facultad de despertar espontáneamente “sedación consciente” o sin preservarla, con pérdida parcial o total de la reactividad frente a estímulos “sedación profunda”. Aunque pueden disminuir la intensidad de la percepción de los estímulos dolorosos al suprimir la ansiedad y la aprehensión, los sedantes carecen de actividad intrínseca analgésica, por lo que la agitación secundaria a dolor deberá manejarse siempre con analgésicos. El sedante ideal debe ajustarse en lo posible a las siguientes condiciones (Valdivielso, 1998):

- Comienzo de acción rápido
- Vida media corta
- Eliminación mediante metabolitos inactivos
- Metabolismo y eliminación no condicionada a órganos susceptibles de fracaso (hígado y riñón)
- Carente de interacciones medicamentosas
- Suficiente efecto sedante sin repercusión hemodinámica o respiratoria
- Ausencia de toxicidad hepática, renal, medular o suprarrenal.

Dado que no existe una sustancia que cumpla todas estas condiciones, se emplean un gran número de fármacos sedantes con indicaciones más o menos concretas (Valdivielso, 1998).

Fármacos ansiolíticos e hipnóticos

Los agentes utilizados para inducir el sueño y producir sedación fueron, a lo largo de muchos siglos, el alcohol y los preparados de opio. A mediados del siglo XIX se introdujeron medicamentos más selectivos para el tratamiento de la ansiedad y de los trastornos del sueño como los bromuros, el hidrato de cloral, el paraldehído, el uretano y el sulfonal, todos los cuales se abandonaron hace ya muchos años. A principios de este siglo se sintetizaron los primeros barbitúricos, fármacos que se emplearon profusamente durante algo más de cincuenta años; sin embargo, su uso implicaba riesgos elevados debido a su potente efecto sedante, a la facilidad con que originaban la muerte del sujeto por depresión respiratoria en caso de sobredosificación y a su capacidad de causar cuadros de dependencia, por lo que se intentaron obtener agentes alternativos que poseyeran idéntica eficacia pero menor toxicidad; de esta forma surgieron la glutetimida y la metacualona que, no obstante, quedaron relegadas al comprobarse que no aportaban ninguna ventaja terapéutica real respecto a los barbitúricos. En 1955 se sintetizó el meprobamato y en 1961 comenzaron a emplearse clínicamente las primeras benzodiazepinas: el clordiazepóxido y el diazepam. Este último grupo de fármacos implicó un gran avance terapéutico, puesto que la mayoría de los mismos posee un efecto ansiolítico selectivo del que carecen los barbitúricos siendo, asimismo, agentes mucho menos tóxicos (Rall y Schleifer, 1990).

En la actualidad, si bien las benzodiazepinas continúan siendo los medicamentos de mayor uso en el tratamiento de la ansiedad y del insomnio, se dispone de nuevos productos pertenecientes a distintos grupos químicos (ciclopirrolonas, azapironas, imidazopiridinas, 3-carbolinas, etc.) cuyo potencial terapéutico, en lo que respecta a sus ventajas e inconvenientes, se irá estableciendo con precisión a lo largo de los próximos años a medida que se vaya extendiendo su utilización en la práctica clínica. En la Tabla 5 se exponen los principales grupos de fármacos disponibles en calidad de ansiolíticos y de hipnóticos; debe destacarse que si bien en dicha tabla se cita tanto al meprobamato como al clometiazol, ambas

son sustancias que cada vez se utilizan con menor frecuencia debido a que se dispone de agentes más efectivos y/o menos tóxicos (Pita y Manzanares, 1992).

Tabla 5. Medicamentos disponibles para el tratamiento de la ansiedad y del insomnio.

Ansiolíticos	Hipnóticos
Benzodiacepinas	Benzodiacepinas
Meprobamato	Meprobamato
Azapironas	Clometiazol
β -bloqueantes	Barbitúricos
Alpidem	Zopiclona
	Zolpidem

Tomado y modificado de Pita y Manzanares, 1992.

Benzodiacepinas (BZD)

- *Acción ansiolítica e hipnótica:* la mayoría de las benzodiacepinas ejercen un efecto dual dependiendo de la dosis administrada: en dosis bajas o moderadas reducen el nivel de ansiedad sin originar un grado de sedación relevante en tanto que en dosis elevadas facilitan el sueño. Ello depende tanto de factores farmacocinéticos, como son la velocidad de absorción del fármaco y su penetración en el SNC, como de factores farmacodinámicos, es decir de la afinidad y actividad intrínseca del medicamento sobre sus receptores específicos. Algunas benzodiacepinas tienden con mayor facilidad a originar sedación marcada y a inducir el sueño, siendo difícil de obtener con ellas un efecto ansiolítico selectivo; este subgrupo lo constituyen las denominadas "benzodiacepinas hipnóticas" utilizadas preferentemente en el tratamiento del insomnio (Pita y Manzanares, 1992).

Acción miorrelajante: todas las benzodiacepinas, en mayor o menor grado, relajan el músculo esquelético actuando a nivel central tanto supraespinal como espinal. Aunque este efecto es ampliamente utilizado en el tratamiento de diversas

patologías, presenta el inconveniente de que requiere administración de dosis suficientemente elevadas para originar sedación; en el ser humano, únicamente el clonazepam llega a originar relajación muscular administrado en dosis no sedantes (Rall y Schleifer, 1990).

- *Acción anticonvulsivante:* las benzodicepinas se comportan como antiepilépticos muy efectivos tanto a nivel experimental como clínico, pudiendo utilizarse en el tratamiento agudo de los estados de mal y en el tratamiento profiláctico de las epilepsias; en este último contexto, sin embargo, presentan la desventaja de originar su tolerancia con elevada frecuencia, lo que limita sustancialmente su efectividad terapéutica (Rall y Schleifer, 1990).
- Se admite que todos los efectos farmacológicos de las benzodicepinas se originan a través de su unión con receptores específicos denominados receptores benzodicepínicos; recientemente, al haber sido sintetizadas diversas sustancias de estructura no benzodicepínica que también se fijan a dichos receptores, se ha propuesto cambiar su denominación por la de receptores "omega" (Pita y Manzanares, 1992).

Existen tres tipos fundamentales conocidos de receptores para las benzodicepinas:

- a) *Receptores ligados al complejo macromolecular GABA_A:* fueron los primeros en ser descubiertos e, inicialmente, se clasificaron como un grupo homogéneo. El receptor GABA_A media la mayor parte de los efectos inhibidores de este neurotransmisor en el SNC; su activación facilita la entrada de Cl⁻ en el interior de las neuronas y, en consecuencia, origina un estado de hiperpolarización que aumenta la refractariedad de estas células ante otros estímulos. Hoy se sabe que existen múltiples formas de receptores gabérgicos-A, ya que éstos están constituidos por cinco subunidades de las que se conocen los tipos α , β , γ , δ o ϵ , o cada una de las cuales, a su vez, puede mostrar más de una variante isomorfa, lo que

confiere una extraordinaria plasticidad a esta clase de receptores y explica las diferencias observadas en la acción de diversos fármacos que actúan a este nivel (Zorumski e Isenberg, 1991). Basándose en la afinidad de distintos fármacos sobre los receptores de las benzodiazepinas, se han clasificado éstos en dos subtipos, etiquetados como omega-1 y omega-2; los primeros median la actividad ansiolítica e hipnótica, en tanto que los segundos parecen estar específicamente relacionados con el efecto miorrelajante (Langer y Arbilla, 1991; Zivkovic, Perrault, Sanger, 1991).

- b) *Receptores mitocondriales*: inicialmente se etiquetaron como receptores "periféricos" de las benzodiazepinas, ya que se detectaron diversos tejidos periféricos; posteriormente pudo comprobarse que también se encuentran en el SNC por lo que se han clasificado como receptores omega-3. Estos receptores se encuentran en la membrana externa de las mitocondrias y parecen hallarse implicados en la síntesis de esteroides por estas últimas (Papadopoulos, 1991). Se desconoce su posible significado psicopatológico y si las benzodiazepinas median algún tipo de efecto relevante a este nivel; recientemente, no obstante, se ha apreciado una disminución de este tipo de receptores en sujetos con ansiedad crónica generalizada y en sujetos con trastorno obsesivo-compulsivo (Ravizza, Patrizia, Paola, Carola, Paolo, Nicoletta, Enrico, Bruno. 1991).
- c) *Receptores micromolares*: se encuentran también en el SNC y las benzodiazepinas únicamente se unen a ellos cuando se encuentran en concentraciones muy elevadas; su activación está relacionada con la inhibición de la entrada de Ca^{+2} en la neurona. Se ha postulado que la acción antiepiléptica de las benzodiazepinas en los estados de mal podría estar mediada a nivel de estos receptores (Haefely, 1989).

Barbitúricos

Se comportan también como agonistas de los receptores GABA_A, si bien su lugar de fijación no es el mismo que el de las benzodiazepinas. El hecho de que el

efecto de los barbitúricos sea más intenso y menos selectivo que el de las benzodiacepinas no se debe únicamente a sus diferencias de acción a nivel gabérgico sino a que los primeros actúan también a otros niveles, como es antagonizando el efecto excitador del ácido glutámico y, en concentraciones más elevadas, interfiriendo el transporte de Ca^{+2} , Na^{+} y K^{+} a través de la membrana neuronal (Prichard y Ransom, 1989).

Imidazopiridinas

Tanto el Zolpidem (hipnótico) como el Alpidem (ansiolítico) son sustancias con afinidad selectiva respecto a los receptores omega, ya que ambos se unen al subtipo omega-1 pero no al subtipo omega-2 (Langer y Arbilla, 1991). El hecho de que estos dos fármacos carezcan de efecto miorrelajante ha favorecido la hipótesis de que éste se encuentra mediado por la activación de los receptores omega-1'. El alpidem muestra también una elevada afinidad hacia los receptores omega-3 pero no parece que ello influya directamente sobre su acción ansiolítica (Pita y Manzanares, 1992).

Ciclopirrolonas

Por el momento, el único representante de este grupo es la zopiclona. Este fármaco se comporta como una benzodiacepina de acción corta preferentemente hipnótica. Actúa como agonista a nivel de los receptores omega-1 y omega-2 (Pita y Manzanares, 1992).

Azapironas

La buspirona, gepirona e ipsapirona son fármacos de moderada capacidad ansiolítica que únicamente se evidencia cuando se administran de forma crónica; en la actualidad se están estudiando también en calidad de antidepresivos (Rickels y cols., 1990; Rausch y cols., 1990; Heller, Beneke, Kuemmel, Spencer, Kurts, 1990). Son agentes agonistas parciales de los receptores 5-HT_{1a}; en consecuencia, su acción se centra en la regulación de la neurotransmisión serotoninérgica, sin afectar a la

neurotransmisión gabérgica; no puedan ser utilizados como hipnóticos, ya que carecen de efecto sedante directo (Conde y Martínez, 1990).

β -bloqueantes

Estos fármacos se utilizan, basándose en su antagonismo competitivo sobre los receptores (β -adrenérgicos, esencialmente para tratar las manifestaciones somáticas de la ansiedad tales como temblor, taquicardia, sudoración, etc (Tyrer, 1988).

Estudios experimentales *in vitro* e *in vivo*

La expresión latina *in vivo* significa «que tiene lugar dentro de un organismo». Se refiere a la experimentación realizada en un organismo vivo como, por ejemplo, pruebas con animales de laboratorio o ensayos clínicos realizados en pacientes. En biología molecular, *in vivo* se utiliza con frecuencia para referirse a la experimentación realizada con células vivas en cultivo y no en un organismo entero. Puede hacer referencia a cualquier tipo de experimentación por oposición a lo que se hace *in vitro*, es decir, en un ambiente controlado fuera del organismo vivo; por ejemplo, los experimentos de propagación de plantas que se hacen en viveros se consideran *in vivo*, al contrario de lo que sucede cuando se propagan plantas en tubos de ensayo, que se considera *in vitro*. En ambos casos, el sujeto de experimentación está vivo (Gago, 2019).

Ventajas y Desventajas de la experimentación *in vitro*

La principal ventaja de trabajar *in vitro* es que permite un enorme nivel de la simplificación del sistema bajo estudio, por lo que el investigador puede centrarse en un pequeño número de componentes. Por ejemplo, la identidad de las proteínas del sistema inmune (anticuerpos). Por otra parte, la principal desventaja de los estudios experimentales *in vitro* es que a veces puede ser muy difícil extrapolar a partir de los

resultados de los ensayos realizados a la biología del organismo intacto. Los investigadores deben ser cuidadosos durante la realización del trabajo *in vitro* para evitar la mala interpretación de sus resultados, a veces puede llegar a conclusiones erróneas acerca del organismos y biología de los sistemas estudiados (Gago, 2019).

Ventajas y Desventajas de la experimentación *in vivo*

En los experimentos *in vivo* se observa más información de lo que realmente está pasando dentro de las células (las propiedades fisicoquímicas son diferentes a la de soluciones acuosas diluidas, lo que puede haber un problema con los estudios *in vitro* ya que las constantes estimadas *in vitro* pueden ser muy diferentes a la real “*in vivo*”). Todas las células contienen varios tipos de maquinaria y pequeñas moléculas que pueden ayudar a su experimento. Al mismo tiempo esto es una desventaja porque tiene demasiados parámetros que no se pueden controlar totalmente. Por otra parte los organismos vivos exhiben una gran variabilidad, incluso con el tiempo, que no puede ser realmente controlada (Gago, 2019).

Animales de Experimentación

El animal de laboratorio se define como un “reactivo biológico” cuya pureza debe ser vigilada, controlada y contrastada al igual que cualquier otro reactivo. Los factores biológicos (bacterias, parásitos, hongos y virus), son los que causan mayor problema sanitario en los animales cuando están presentes (Zúñiga, Tur-Marí, Milocco y Piñeiro, 2001; Benavides y Guenét, 2003; De Osorio, 2006).

Cada especie animal tiene características propias que pueden convertirse en criterios de elección para el investigador. Obviamente, para realizar un experimento eficaz, deben conocerse esas características; aunque cualquier especie puede ser utilizada en la experimentación animal desde la *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) hasta el hombre; no obstante la legislación que regula la experimentación animal, sólo considera la protección de los vertebrados como animales empleados con fines científicos (Zúñiga y Milocco, 2000).

Si la experimentación se lleva a cabo con determinadas especies, los animales deben ser criados específicamente para ese fin, procediendo de establecimientos registrados y autorizados. Independientemente de si el animal forma parte de estas determinadas especies, siempre que sea posible se deberán utilizar animales de cría. Animales criados en centros dedicados a la obtención de animales de laboratorio (animalarios, bioterios, estabularios o unidades de producción y/o experimentación animal). Éstos, suministran los individuos a los investigadores y/o mantienen los animales en fase experimental, asesorando a otros centros productores o a los usuarios, en las fases pre/post-experimental (Zúñiga y Milocco, 2000).

Los experimentos con animales se utilizan ampliamente para desarrollar nuevas medicinas y para probar la seguridad de otros productos, muchos de estos experimentos causan dolor a los animales involucrados o reducen la calidad de vida de otras maneras. En todo el mundo se usa para vivisección una amplia gama de especies, siendo las ratas y ratones quienes se llevan la mayor proporción de los experimentos de laboratorio, sobre todo porque son fáciles de manejar y baratos de mantener por su pequeño tamaño. Ocupan menos sitio en un laboratorio que otros animales más grandes, y además tienen de 50 a 100 crías al año (Salgado, Salinas, Salinas y Núñez, 2012).

El animal de laboratorio tiene que ser respetado como ser vivo, entender que padece necesidades y sufre dolor, por ley es obligación del personal que lo cuida, mantiene y utiliza (investigador), asegurar su bienestar y confort mientras viva (Pallo, 2012). Estos deben:

- Ser engendrado y producido en condiciones controladas y mantenidos en un entorno controlado.
- Poseer claros antecedentes genéticos y microbiológicos.
- Que exista una comprobación sistemática de estos antecedentes.

Tipos de animales de Experimentación

El animal de laboratorio es una de las piezas fundamentales en las ciencias biomédicas. Son usados como modelos para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al humano y a los animales, y en el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos y otros insumos. Por esta razón se requiere la producción de animales “estandarizados o definidos” con características genéticas y sanitarias definidas, criados en ambientes controlados que respeten los requerimientos de la especie, con el correcto cumplimiento de los principios éticos y de bienestar animal (Cedamano, 2019). Algunos de los animales de experimentación utilizados en laboratorios, según Sanmartín (2012) son:

1. Ratas (Rattus norvegicus)

Rattus es un género de roedores miomorfos de la familia Muridae, conocidos comúnmente como ratas. Son roedores de mediano tamaño que no sobrepasan los 300 g de peso y los 30 cm, más una cola de similar longitud. Las patas anteriores son cortas y con cuatro dedos (el pulgar, rudimentario) y las posteriores, más largas, con cinco dedos ver Figura 8 (Salgado y cols, 2012).

Durante muchos años las ratas se han usado en multitud de experimentos y estudios, lo que nos ha ayudado a entender más sobre su genética, enfermedades, etcétera, llegando a convertirse en el modelo de estudio más popular para hacer según qué tipo de pruebas científicas: (Salgado y cols, 2012).

Sprague-Dawley: Son un tipo de rata albina muy tranquila y fácil de manejar en el laboratorio.

- Wistar: Crecen más lentamente que la Sprague-Dawley y también es albina. Es un modelo general en investigación biomédica, muy utilizadas en toxicología.
- Long Evans: Se utilizan para estudios de psicología y comportamiento (estos típicos que incluyen laberintos, por ejemplo). No son albinas.
- Fisher F344: Se utilizan para estudios de inmunología y teratología.

- SHR y WKY: Se utilizan para el estudio de la hipertensión.
- Ratas silvestres (llevadas a laboratorio, manteniendo colonias de forma exocriada). Se utilizan en estudios de epidemiología de zoonosis tropicales. Son reservorios u hospederos intermediarios de enfermedades (encefalitis equina venezolana, Leishmaniasis, equinococosis tropical y Chagas. Además son utilizadas para estudios neurológicos por su resistencia a epilepsias (Gago, 2019; Salgado, Salinas, Salinas y Núñez, 2012).

Figura 8. Modelo experimental de la especie *Rattus norvegicus*.



Tomado y modificado de Gago, 2019.

2. Ratones

El ratón de laboratorio es un roedor, usualmente de la especie *Mus musculus*, que se utiliza para la investigación científica. Su cariotipo está compuesto por 40 cromosomas y suelen ser albinos. Es una especie cosmopolita, que se adapta a una gran variedad de condiciones ambientales, desde zonas muy frías hasta regiones tropicales. En general, las especies prefieren ambientes más secos que húmedos. Los ratones, por normal general, son más pequeños que las ratas, también más domésticos y tolerarán mejor la presencia y manipulación humana ver Figura 9.

Ratones albinos: Carácter dócil, poseen excelentes características reproductivas y maternas con un promedio de crías de aproximadamente 11. Son usados para todo tipo de experimentos, incluyendo modelos de seguridad y eficacia de medicamentos, estudios de retinopatías, Oncología, Toxicología, Teratogénesis además en modelos de envejecimiento y cirugía.

- Ratones albinos Naval Medical Research Institute (NMRI): son los usados como modelo en general, incluyendo experimentos toxicológicos, teratológicos, psicofarmacológicos y fisiológicos.
- Ratones de líneas consanguíneas: son ratones muy dóciles con un promedio de 6 crías. Si bien el motivo inicial del desarrollo de estas líneas fue demostrar las bases genéticas de varias formas de cáncer, estas líneas han jugado un papel crucial en todas las áreas de la genética del ratón (Gago, 2019).

Figura 9. Cepas de modelos experimentales de ratones (*Mus musculus*)



Tomado y modificado de Gago, 2019.

3. Cobayas (*Cavia porcellus*)

También conocidos como conejillo de Indias debido a su procedencia andina, puede llegar a pesar un kilo y es un animal ampliamente usado en la experimentación científica. Las cepas más comunes son la Hartley (albina) y la BFA (tri-color) ver Figura 10 (Gago, 2019).

Figura 10. Imagen modelo de un conejillo de Indias (*Cavia porcellus*)



Tomado y modificado de Gago, 2019.

4. Conejos (*Oryctologus cuniculis*)

Los conejos son otro popular grupo de roedores usados en modelos experimentales científicos debido a su buen temperamento, a su fácil manejo, cuidado y reproducción. La cepa más usada y estudiada es la New Zealand White, que como bien indica su nombre, es albina ver Figura 11 (Gago, 2019).

Figura 11. Conejos de experimentación de la especie *Oryctologus cuniculis*.



Tomado y modificado de Gago, 2019.

Características de los ratones de experimentación

El ratón de laboratorio es un modelo ideal para el estudio de la fisiología y la fisiopatología humana. Los humanos y los ratones pueden no parecerse mucho, pero los genes de ratones y humanos son aproximadamente 95 % idénticos en sus regiones de codificación y funcionan prácticamente de la misma manera en un contexto biológico. La subespecie más prominente de ratones representados en ratones de laboratorio es el *Mus musculus domesticus* (Hedrich, 2012).

El ratón es un mamífero de sangre caliente, de hábitos nocturnos y su comportamiento está influenciado por feromonas. Posee un agudo sentido de la audición, por lo que se alteran rápidamente con los ruidos. Su sentido del olfato está muy desarrollado, no sólo para detectar comida y depredadores, sino también para percibir un orden social. Su visión es muy pobre y no pueden percibir los colores. En la órbita del ojo posee unas glándulas con forma de herradura llamadas glándulas Harderianas, cuando el ratón está en estrés, excreta en la zona periocular una sustancia de color marrón llamada porfirina (Sanmartín, 2012).

El sistema social depende de la densidad de población, viven en grandes colonias y el rango social está bien desarrollado. Generalmente, son muy dóciles a excepción de algunas cepas exocriadas que mantienen su agresividad, al igual que sus antecesores salvajes. Por su pequeño tamaño son muy susceptibles a cambios ambientales, puesto que una variación de la temperatura entre 2 a 3 °C, puede afectar su temperatura corporal y modificar su fisiología. El tamaño del ratón adulto varía entre 12 a 15 cm desde la punta de la nariz a la punta de la cola; el largo de la cola es igual al largo del cuerpo y con un peso aproximado de 30 g. Las crías al nacer tienen un peso aproximado de 1 a 2 g y gana rápidamente peso durante la lactancia. Tienen una vida útil de 10 a 12 meses y se obtiene de ocho a diez camadas (Sanmartín, 2012).

El microambiente, es el ambiente físico inmediato que rodea al ratón, también llamado confinamiento o encierro primario, está limitado por el perímetro de la jaula o caja, cama, alimento y agua de bebida; deben contribuir a la salud de los animales, y evitarles todo estrés, por lo que deberá asignársele, a cada uno, un espacio adecuado que le permita movimientos y adopciones de posturas normales, preservando a su vez las mínimas condiciones de higiene y de protección contra insectos, roedores y otras plagas. El microambiente lo conforman la caja o jaula, el alimento, el agua, así como el mantenimiento de las condiciones de higiene de cada uno de ellos. A continuación se mencionan algunas ventajas y desventajas del uso de ratones como animales de laboratorio (Pallo, 2012):

Ventajas

- De fácil cuidado y mantenimiento, por su pequeño tamaño.
- Bajos costo de manutención.
- Cepa definida.
- Diversidad de características específicas que sirven como modelo.
- Eficiencia reproductiva.
- Por su vida relativamente corta es excelente para su uso en ensayos crónicos de toxicología, microbiología, virología, farmacología, etc.
- Corto tiempo de generación.

Desventajas

- Dificultad en la recolección de material biológico.
- Dificultad la administración de drogas.
- Dificultad en las técnicas quirúrgicas.

La experimentación animal es un método científico que tiene como objetivo el empleo de uso de animales para experimentos científicos. No es método recomendado siempre que existan alternativas en experimentación con el mismo nivel de evidencia científica, pero en determinados casos es necesario su uso ya que no puede realizarse los experimentos con humanos. La mayoría de los animales utilizados para la investigación son la raza con el propósito específico de pruebas y pocos animales utilizados para experimentación son criados en el medio silvestre (Fuentes, Mendoza, Rosales y Cisneros, 2008).

Pruebas de laboratorio en animales para determinar la actividad sedante

1. Modelos de respuestas condicionadas

Modelo mediante el cual con un choque eléctrico aplicado en el animal se recibe una respuesta específica, esta es una técnica dolorosa y agresiva para quién lo recibe. Para la realización de estas pruebas se necesita que el animal a experimentar este entrenado, obteniendo así resultados confiables de los niveles de conducta basal (Polanco, 2011).

2. Modelos de respuestas no condicionadas

Se mide la respuesta emitida por parte del animal experimentado frente a eventos nuevos o estresantes. En este se determina el comportamiento del animal en los distintos equipos, es decir cómo reacciona ante la luz, oscuridad, campos abiertos, cerrados, entre otros. Estas pruebas intentan mantener el microambiente del animal, como la comida y el agua, no se necesita de entrenamiento y no se someten a choques eléctricos, una de las ventajas para su uso es que poseen cierta

validez ecológica por ser una prueba rápida, sencilla y económica. Las pruebas de ansiedad poseen sensibilidad bidireccional, además no se requiere de largos procedimientos (Polanco, 2011).

A continuación se mencionan algunas de las pruebas de experimentación con modelos no condicionados aplicados.

- *Test de la placa agujereada*

La prueba de la placa agujereada según Boisser mide la actividad de un ratón en una situación libre. Se realiza en una tabla cuadrada con 16 agujeros (Figura 12) en donde el ratón pasa periódicamente la cabeza dentro de los agujeros, se determina el número de agujeros explorados cada minuto durante 5 minutos. El test permite apreciar la curiosidad, la actividad exploradora y eventualmente la ansiedad; por lo cual estos efectos permiten seguir la reacción de exploración, comportamiento y curiosidad del ratón. Consiste en colocar delicadamente al ratón en el centro de la tabla. El número de agujeros explorados son contados y anotados al término de cada minuto durante 5 minutos; no se toma en cuenta el paso del ratón por el agujero sin exploración, la exploración de los bordes de la tabla, ni la introducción de la cabeza en el mismo agujero varias veces. Se anota el número de agujeros explorados por minuto y el número total durante los 5 minutos. Esta prueba es positiva cuando el número de agujeros explorados por el animal tratado con la muestra en estudio disminuye hasta acercarse o igualarse al tratado con el fármaco de referencia (Roca, 2005).

Figura 12. Patrón de placa agujereada según Boisser



Tomado y modificado de Gago, 2019.

- *Test de Rota Rod*

La prueba de Rota Rod según Bhargava & Chandra y Kinnard & Carr, evalúa los reflejos de equilibrio y coordinación en ratones, la administración de un inhibidor del Sistema Nervios Central (SNC) provoca disturbios de coordinación y caída del animal. El modelo Rota Rod (Figura 13) es muy sensible para medir la ansiedad y la relajación muscular en ratas. El equipo consta de cuatro tambores de siete centímetros de diámetro colocados verticalmente, el modelo cuenta con cuatro platos que se colocan en la parte inferior de los tambores, poseen un guardador de níquel blindado con hierro montado debajo de cada plato, esta parte debe tocar el imán y el resorte inoxidable, ejerciendo una ligera presión sobre el eje. De esta manera cada imán es conectado eléctricamente al eje cerrando el circuito de poder al tablero correspondiente (Gorry, 2008).

El circuito se rompe cuando el guardador de níquel pierde contacto con el imán, deteniéndose el tiempo en el tablero, esto ocurre cuando el animal cae del cilindro sobre el plato. El modelo presenta tres opciones: acelerar (aumenta las revoluciones por minuto), bloquear (mantiene la velocidad constante) y reset (mantiene el Rota Rod girando a una velocidad mínima). Se

verifica con anterioridad que los ratones sean capaces de mantenerse indefinidamente sobre el eje que gira, son entrenados consecutivamente, observándose durante dos minutos; los ratones que no logran mantenerse se descartan del test. Consiste en mantener un ratón en posición en un eje que gira a 10 rpm durante 3 minutos. Las mediciones se realizan a los 30 minutos, 1 y 2 horas. De esta manera, se determina la dosis efectiva media (DE_{50}) que hace caer al 50 % de los ratones en menos de 3 minutos con la sustancia en estudio (Gorry, 2008).

Figura 13. Modelo de la prueba de Rota Rod según Bhargava & Chandra y Kinnard & Carr.



Tomado y modificado de Gago, 2019.

- *Laberinto elevado en cruz (LCE)*

Ha sido utilizado para medir el comportamiento espontáneo del roedor, creando un ambiente de aproximación y evitación. El LCE contiene dos brazos abiertos y dos brazos cerrados y se evalúa el tiempo y la frecuencia de entradas a ellos (Figura 14). Además, se mide el “head-deeping” que consiste en asomarse por debajo de los brazos abiertos, la postura de estiramiento,

exploración, locomoción y acicalamiento son indicadores del nivel de ansiedad y el nivel de evaluación sobre la exploración en un ambiente desconocido. Como se mencionó, en esta prueba el animal tiene el conflicto entre la evitación y el acercamiento, ya que el animal evita espacios abiertos donde, de acuerdo con la etología del roedor, hay mayor posibilidad de depredación, sin embargo, su conducta exploratoria lo motiva a recorrer los brazos abiertos. El laberinto en cruz elevado ha sido ampliamente utilizado por sus ventajas en cuanto a la facilidad de la aplicación de la prueba, ya que en general se trata de una prueba simple que no requiere entrenamiento del animal (Gallegos y Castillo, 2015).

Este experimento consiste en colocar los ratones a evaluar en el centro de una estructura que tiene la forma de cruz, está elevada respecto del nivel del suelo, y presenta la particularidad que dos de sus ramas contienen paredes a sus costados que dan la sensación de lugar cerrado y oscuro; mientras que las otras dos ramas se denominan “abierta” porque no presentan dichas paredes a sus lados. Las ramas abiertas y cerradas se encuentran enfrentadas. La evaluación consiste en colocar los ratones en el centro de la estructura y determinar la cantidad de veces que el ratón ingresa a cada tipo de rama y el tiempo que permanece en su interior en un periodo determinado (generalmente es de 5 minutos). Esta prueba se lleva a cabo para evaluar la actividad ansiolítico de la droga en cuestión; y el fundamento radica en que los ratones son animales de hábito nocturno, por lo que se estima que permanecerán, preferentemente, en la “rama cerrada”. De esta manera, un aumento en los tiempos de permanencia en la “rama abierta” implica un efecto ansiolítico des-inhibitorio de la droga en cuestión (Miranda, Conde, Celis y Corzo, 2009).

Figura 14. Modelo de Laberinto elevado en cruz (LCE)

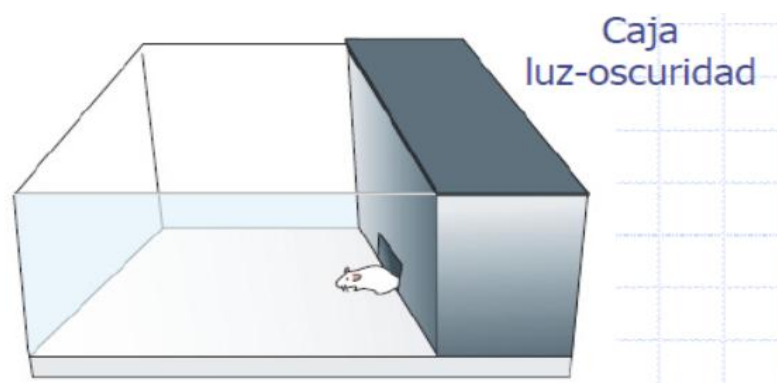


Tomado y modificado de Gago, 2019.

- *Campo claro-oscuro*

Es una de las pruebas más utilizadas para medir la ansiedad como el comportamiento de los ratones. La prueba se basa en la aversión natural de los ratones a las zonas muy iluminadas y en su comportamiento espontáneo de exploración en ambientes nuevos. La prueba es sensible al tratamiento con medicamentos ansiolíticos. El aparato posee dos compartimentos, el cuarto claro y el oscuro. Los ratones se les permiten moverse libremente entre los dos compartimentos ver Figura 15 (Takao y Miyakawa, 2006).

Figura 15. Patrón experimental de caja de campo claro-oscuro.

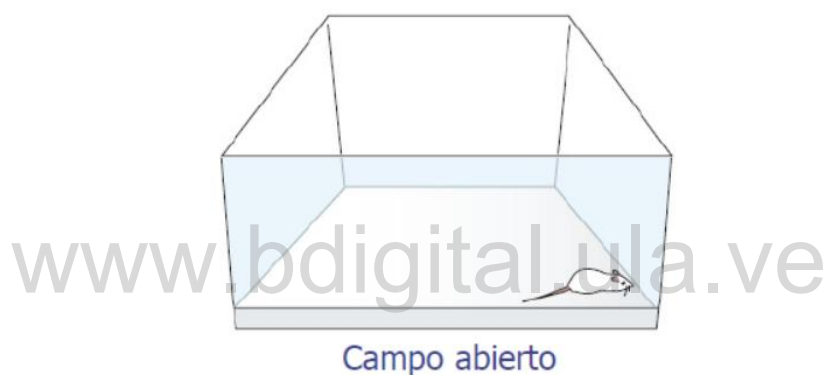


Tomado y modificado de Gago, 2019.

- *Campo abierto*

La prueba consiste en colocar al roedor de manera individual en una caja de acrílico (Figura 16). En este equipo se somete al animal a un ambiente inexplorado del cual no puede salir debido a la presencia de paredes que se lo imposibilitan. La prueba involucra la exposición del animal a una situación estresante, durante este período, se evalúa la ansiedad, locomoción, elevaciones, defecaciones y tiempos que permanecen en el centro, interior, laterales y esquinas del equipo (Pérez y González, 2015).

Figura 16. Caja de acrílico para prueba de campo abierto.



Tomado y modificado de Gago, 2019.

- *Prueba de la chimenea*

La prueba de la Chimenea según Boisser permite apreciar las funciones de equilibrio y tono muscular. En dosis altas, la mayoría de los agentes neurolépticos aumentan el tono muscular y es característica la ptosis parpebral. El tubo se coloca en posición horizontal, luego se introduce por la boca del tubo al ratón con la cabeza hacia delante, empujándolo con una varilla de vidrio, hasta que llegue al otro extremo; se coloca el tubo en posición vertical e inmediatamente el ratón intenta subir en retroceso. Se observa y anota el tiempo de subida hasta la marca a 20 cm de la base del tubo (Reyes y Saravia, 1995; Velis, 1999; Bonilla y Saravia, 2003; Saravia, 2004).

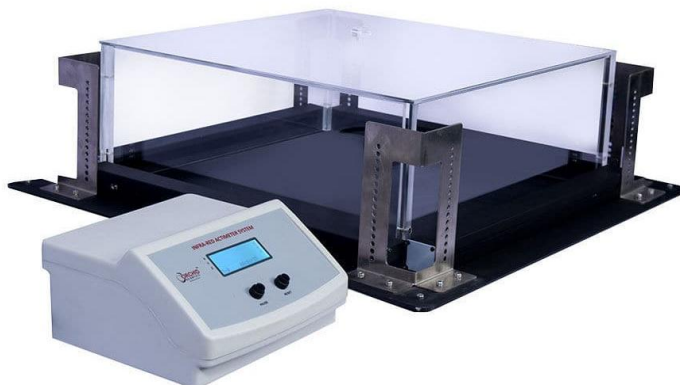
- *Test de Potenciación del Sueño*

El test de potenciación del sueño según Winter permite medir la influencia de un medicamento o planta medicinal sobre la duración del sueño inducido por un hipnótico. Esta prueba es utilizada para el estudio de fármacos psicolépticos (hipnóticos). El criterio es la pérdida del reflejo de enderezamiento que permite anotar el tiempo de adormecimiento de los ratones. El regreso del reflejo de enderezamiento marca el despertar del ratón. Se anota a partir del tiempo 0 la duración del adormecimiento y la duración del sueño. Se comparan los tiempos de adormecimiento y los tiempos de sueño de los animales testigos y de los tratados (Reyes y Saravia, 1995; Velis, 1999; Bonilla y Saravia, 2003; Saravia, 2004).

- *Actividad locomotora espontanea*

Para este ensayo se utiliza una cámara de actividad locomotora automatizada (Figura 17), hecha de una caja de madera abierta de 40 x 40 x 35 cm³, con sensores infrarrojos de movimientos colocados a intervalos de 10 cm, y equipada con contadores digitales. Los animales objeto de estudio se colocan en el centro de la cámara y observados durante un periodo de 5 minutos, registrando el número de veces que el ratón se colocaba en posición vertical (se entiende como una posición vertical cuando el animal se levanta en 2 patas) (Thiruchelvam, Brockel, Richfield, Baggs y Cory, 2000).

Figura 17. Cámara de actividad locomotora automatizada.



Tomado y modificado de <https://www.medicalexpo.es/>

- *Actividad del laberinto*

El ensayo se inicia al colocar al animal en el compartimiento de inicio de un cajón con divisiones en laberinto (Figura 18), cerrándose tras él la puerta para impedir que el animal volviese a salir. Finaliza con la llegada del animal al compartimiento de meta (4 patas fuera del compartimiento de salida). El tiempo se controla mediante un cronómetro y el número de veces que el animal llega hasta el compartimiento de salida del laberinto. Las medidas consideradas son: Tiempo (en segundos) de llegada a la meta del animal en cada ensayo y el número (n) de veces que el ratón completaba la actividad en un periodo de 5 minutos (Saravia, 2004).

Figura 18. Cajón con divisiones en laberinto.



Tomado y modificado Saravia, 2004.

Definición Operacional de Términos

Analgesia: abolición de la percepción del dolor sin intención de producir sedación, que en caso de aparecer será como efecto secundario a la medicación (Brandstrup y Reina, 2013).

Ansiedad: distorsión del nivel de conciencia aumentando la percepción del entorno y la reactividad (Brandstrup y Reina, 2013).

Ansiolisis: sedación consciente, mínima depresión de la conciencia controlada con el paciente reactivo (Brandstrup y Reina, 2013).

Dolor: experiencia emocional y sensorial desagradable asociada a daño tisular real o potencial (Brandstrup y Reina, 2013).

Hipnosis: sedación profunda, con depresión de la conciencia médicamente controlada donde el paciente no puede ser despertado con facilidad y que puede llegar hasta la pérdida de los reflejos protectores y de la respiración espontánea (Brandstrup y Reina, 2013).

Neurotrasmisor: Es una sustancia química de origen neural que se libera de una terminación nerviosa presináptica después de su estimulación, es reconocido por receptores específicos en la membrana postsináptica y ocasionan excitación o inhibición de la actividad fisiológica de la neurona postsináptica (Brandstrup y Reina, 2013).

Polisomnograma: Es el registro continuo y simultaneo de variables fisiológicas durante el sueño, por ejemplo EEG y MO (las variables básicas), electrocardiograma, movimientos respiratorios, diafragmáticos, flujo de aire respiratorio, movimientos de miembros inferiores y otras de diversa índole tales como observación del comportamiento, erección peneana, cambios endócrinos, control del relato de ensueños, etc (Velluti, 1987).

Sedación: estado de disminución de la conciencia del entorno, manteniendo habitualmente respiración espontánea (Brandstrup y Reina, 2013).

Operacionalización de las Variables

La operacionalización de las variables se emplea en la investigación científica para designar al proceso mediante el cual se transforma la variable de conceptos abstractos a términos concretos, observables y medibles, es decir, dimensiones e indicadores; por lo general se representa en un cuadro (Arias, 2006). El proceso de la operacionalización de las variables garantizará que los objetivos propuestos sean alcanzados. En las Tabla 6 y 7 se muestran las variables de la presente investigación.

Tabla 6. Variable Dependiente. Efecto sedante de *Ternstroemia delicatula*

Variable	Tipo de variable	Definición Conceptual ¿Qué es?
Efecto sedante de <i>Ternstroemia delicatula</i>	Dependiente Cuantitativa Discreta	El efecto sedante produce la depresión del sistema nervioso central (SNC), provocando la calma, relajación, reducción de ansiedad, adormecimiento y retardo de ciertos reflejos, que provocan relajación física y mental por acción gabaérgica (Bucciarelli y cols, 2010).
Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
Se mide a través de la evaluación de la : a) Actividad locomotora espontánea. b) Actividad del laberinto.	a) Acciones musculares que permiten el movimiento voluntario o que constituyen una reacción observable en una situación. b) Comportamiento espontáneo y reacción inicial de la exploración en un ambiente nuevo.	a) Número de veces que se levanta el animal en dos patas en un periodo de tiempo (5 minutos). b) Disminución o aumento de la reacción inicial de la exploración.

Autores: Castillo, Gutiérrez, Pérez y Obregón (2021)

Tabla 7. Variable Independiente. Metabolitos secundarios presentes en los extractos de las hojas y tallos de *T. delicatula*

1. Variable	2. Tipo de variable	3. Definición Conceptual ¿Qué es?
Metabolitos secundarios presentes en los extractos de los tallos y las hojas de <i>T. delicatula</i> .	Independiente Cualitativa Discreta	Metabolito secundario es aquel que es propio de una especie, se le conoce también como producto natural y en la mayoría de los casos no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza (Marcano y Hasegawa, 2002).
4. Definición operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicador
Tamizaje fitoquímico: Pruebas químicas cualitativas de coloración y/o precipitación	Alcaloides: reacciones de Dragendorff, Wagner y Mayer.	Aparición de turbidez o precipitados.
	Esteroles y/o triterpenos: Reacción de Lieberman Bouchard.	Coloración verde para esteroles; o rojo para triterpenos.
	Saponinas: prueba de espuma.	Formación de abundante espuma, para saponinas.
	Compuestos fenólicos: con tricloruro férrico.	Coloración de azul a negro.
	Taninos: prueba de gelatina.	Un precipitado blanco indica presencia de taninos.
	Flavonoides: Reacción de Shinoda.	Coloración naranja a rojo, para flavonas; si es rojo flavonoles y magenta flavononas.
	Antraquinonas: con hidróxido de amonio.	Aparición de una coloración roja.
	Quinonas: con ácido sulfúrico concentrado.	
	Glicósidos cardiotónicos: Ensayo de Kedde.	Coloración púrpura o violácea.
	Cumarinas: Hidróxido de amonio.	La presencia de fluorescencia azul-violeta.
	Sesquiterpenlactonas: con Hidroximato férrico	Coloraciones roja, violeta o rosa

Autores: Castillo, Gutiérrez, Pérez y Obregón (2021)

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

En este capítulo se presenta en forma detallada cada uno de los aspectos relacionados con la metodología que se seleccionó para llevar a cabo la investigación. Al respecto Arias (2006) afirma que: “La metodología del proyecto incluye el tipo o tipos de investigación, las técnicas y los instrumentos que serán utilizados para llevar a cabo la indagación. Es el cómo se realizará el estudio para responder al problema planteado”

Tipo de Investigación

En base a la relación que existe entre el objetivo general y el nivel de investigación se determina que la presente es de tipo confirmatoria, ya que, se desea confirmar el efecto sedante *in vivo* de los extractos de las hojas y tallos de *Ternstroemia delicatula* sobre ratones machos Biou: NMRI.

Diseño de Investigación

El diseño de investigación es una estrategia o plan que se desarrolla con la finalidad de obtener la información que se requiere en una investigación y responder al planteamiento (Hernández, Fernandez y Baptista 2014). El diseño de esta investigación será de laboratorio, puesto que se realiza un ensayo *in vivo* con ratones para medir el efecto sedante de *T. delicatula*. Para el cuándo tendrá un diseño contemporáneo y evolutivo. Además, considerando la amplitud de la información será multivariable, relacionado con la composición química de los extractos y el efecto sedante de *Ternstroemia delicatula*. Respecto a la intervención del investigador y al control riguroso de variables, esta investigación tendrá un diseño cuasiexperimental que según el autor antes mencionado define como un conjunto de

datos registrados secuencialmente en una serie discreta de puntos u observaciones de una sola unidad observacional, antes y después de un fenómeno o tratamiento.

Población y Muestra

Unidad de Investigación

Estuvo representada por la especie vegetal *Ternstroemia delicatula* recolectada en la zona oriental de Venezuela cerca del Tigre estado Anzoátegui.

Selección del Tamaño de la Muestra

La muestra estuvo integrada por la recolección de 800 gramos frescos de hojas y tallos de la especie vegetal *Ternstroemia delicatula*.

Sistema de Variables

Las variables relacionadas con el propósito de esta investigación son las siguientes:

Variable dependiente (VD): Efecto sedante de *Ternstroemia delicatula* (Tabla N°6)

Variable independiente (VI): Metabolitos secundarios presentes en los extractos de las hojas y tallos de *Ternstroemia delicatula* (Tabla N° 7)

Instrumentos de Recolección de Datos

Según Arias (2012), un instrumento de recolección de datos se define como un recurso, dispositivo o formato, sea digital o en papel, que permite obtener, registrar o almacenar información referente al evento de estudio. Es por ello que en esta investigación se empleó una serie de instrumentos que facilitaron el registro de los resultados, tales como: tablas, videos y figuras utilizadas en el momento que se realizó el tamizaje fitoquímico y las pruebas de conducta a los ratones.

Procedimientos o Metodologías de la Investigación

1. Recolección e identificación del material vegetal.

Las hojas y tallos de *Ternstroemia delicatula* fueron recolectados en febrero de 2012, cerca de la comunidad del Tigre Edo. Anzoátegui, específicamente en la localidad de "Farallones de Chimire".

La homogeneidad y la autenticidad de la materia vegetal fueron certificadas por los autores (J.R Grande y J. Raydan), un ejemplar fue depositado en el Herbario Nacional de Venezuela (VEN) con el número de voucher (479) (Figura 19).

Figura 19. *Ternstroemia delicatula*, Tomada del Herbario Nacional de Venezuela (VEN).



2. Secado del material vegetal.

Luego de la recolección, el material se dejó al aire libre y el almacenamiento se realizó en recipientes alejados de la humedad para su traslado al Edo. Mérida. Posteriormente, las hojas y tallos de *Ternstroemia delicatula* se secaron en la estufa a una temperatura constante de 37 °C por 30 días.

3. Preparación de los extractos.

El material vegetal fue triturada por separado (hojas y tallos) de forma manual en un mortero de porcelana (Figura 20), se pesaron los estándares secos (Hojas: 200 g; Tallos: 200 g) en una balanza analítica, luego se transfirieron a un balón de destilación y se agregó un volumen de 700 mL de solvente Hexano, la extracción se llevó a cabo en un sistema de extracción continua a reflujo (Figura 21) por 1 hora a 50 °C, posteriormente se filtró y concentró hasta la completa evaporación del solvente por rota vapor (Figura 22). Luego se repitió el procedimiento empleando 500 mL de solvente Etanol.

Figura 20. Trituración de la materia vegetal



Figura 21. Sistema de extracción continúa a reflujo



Figura 22. Evaporación del solvente por rota vapor



4. Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje se llevó a cabo mediante pruebas fitoquímicas con el fin de determinar la presencia de los diferentes grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos de hojas y tallos de *Ternstroemia delicatula*. A continuación se mencionan las pruebas realizadas:

Alcaloides: Para la determinación de alcaloides se realizaron las pruebas de precipitación de la siguiente manera: se tomó una porción del extracto en un tubo de ensayo y se agregó 5 mL de HCl al 10 %, luego de mezclar y se llevó a baño de María por 10 minutos, se filtró y dividió en 2 tubos para realizar el ensayo con los

reactivos de Dragendorff y Wagner. La presencia de alcaloides forma precipitados característicos de color anaranjado y blanco.

Triterpenos y esteroides: se realizó a través de la prueba de Lieberman-Burchard, a una fracción del extracto disuelto en diclorometano se le agregó 0,5 mL de anhídrido acético y 1 gota de ácido sulfúrico concentrado. La reacción es positiva para esteroides si aparece una coloración azul verdoso y color rojo, rosado o púrpura para triterpenos.

Flavonoides: Se usó la prueba de Shinoda, para lo cual se solubilizó cada extracto en su solvente de origen, luego se agregaron virutas de magnesio y gotas de ácido clorhídrico concentrado, las coloraciones rojas indica preliminarmente la presencia de flavonoides.

Compuestos fenólicos: Se hizo la prueba de tricloruro férrico (FeCl_3), al extracto disuelto en agua se le añadió unas gotas de cloruro férrico al 1 %, la aparición de un color verde, azul o negro, indica la presencia de compuestos fenólicos.

Saponinas: La presencia de estos compuestos se determinó a través de la prueba de espuma, para lo cual el extracto disuelto en agua, se agitó por 1 minutos y dejó en reposo. La formación de espuma indica la presencia de saponinas.

Taninos: Se realizó el ensayo de la gelatina, el extracto disuelto en agua se adicionó a una solución de gelatina. La aparición de un precipitado, indica la presencia de taninos.

Antraquinonas: Al extracto previamente disuelto y se le añadió 3 gotas de Hidróxido de Amonio concentrado. La presencia de una coloración roja en los primeros dos minutos, indica la presencia de Antraquinonas.

Quinonas: En una cápsula de porcelana se colocó una porción del extracto y se adicionó una gota de ácido sulfúrico concentrado. La formación de una coloración roja indica la presencia de Quinonas.

Cumarinas: A una porción del extracto se le añadió 0,5 mL de etanol y 2 gotas de hidróxido de amonio concentrado. Se considera positiva la prueba si se presenta una fluorescencia azul- violeta bajo la luz ultravioleta.

5. Determinación de la dosis letal media (DL₅₀)

Se administraron de acuerdo a la regulación de las normas OECD 420 (Procedimiento de Dosis Fija para Toxicidad Oral Aguda) y estudios de actividad terapéutica de productos de origen natural. El procedimiento OECD 420 recomienda administrar un volumen constante en el intervalo de dosis a ensayar, variando la concentración de preparación y respetando el volumen máximo de dosificación de acuerdo a la especie animal y la vida de administración (De 0,2 cc hasta 2 cc).

En el caso particular del presente trabajo se utilizó un volumen fijo (0,2 mL) por grupo, con concentraciones fijas de 5 mg / Kg y 160 mg / Kg de peso corporal para los extractos de hojas y tallos de *T. delicatula*. El ensayo se realizó por 3 días consecutivos de tratamiento en los cuales los animales no tuvieron un aumento significativo en el peso, por lo que no fue necesario aumentar la concentración de los extractos.

6. Determinación de la actividad sedante *in vivo*.

El protocolo experimental y el uso de los animales estuvieron avalados por la Comisión de Bioética BioULA del Bioterio Central de la Universidad de Los Andes, que involucran la protección de animales de laboratorio y usos con fines experimentales. El estudio que se presenta formó parte de una investigación cuyo diseño ha sido aprobado por dicho Comité.

- **Animales de experimentación:** Para los ensayos de actividad sedante se emplearon ratones machos cepa Naval Medical Research Institute (NMRI) estos fueron proporcionados por el Bioterio Central de la Universidad de Los Andes, con edades comprendidas entre 5 y 8 semanas (Figura 23). Se realizó el pesaje de todos los ratones antes de suministrar las dosis para así determinar el peso promedio y los mililitros de solución a aplicar (Figura 24). La Comisión de Bioética BioULA establece que cada grupo experimental debe tener un peso similar con una diferencia no mayor a ($\leq 0.5g$) por cada grupo de estudio, de esta manera garantizar los límites permitidos en el estudio de animales experimentales. Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura ambiente de ($21\pm 22^\circ C$) con un ciclo de 12 horas luz/oscuridad con consumo de agua y alimento a voluntad.

Figura 23. Ratón macho NMRI, Tomada del Bioterio Central de la Universidad de Los Andes.



Figura 24. Pesaje de los animales, Tomada del Bioterio Central de la Universidad de Los Andes.



- **Grupos de estudio:** Para la realización de los ensayos los animales fueron distribuidos al azar en 6 grupos (Figura 25), distribuidos de la siguiente manera (Tabla 8):

Tabla 8. Grupos de estudio experimentales

Grupos	Extracto	Dosis	Cantidad de ratones
Grupo A (Control)	SSF	0,2 mL	1
Grupo B	Etanol Hojas	5 mg/Kg	2
Grupo C	Etanol Tallos	5 mg/Kg	2
Grupo D (Tratamiento)	Nitrazepam	5 mg/Kg	2
Grupo F	Etanol Hojas	160 mg/Kg	2
Grupo G	Etanol Tallos	160 mg/Kg	2

Leyenda: SSF: Solución salina fisiológica. (mg): miligramos. (mL): mililitros. (Kg): kilogramos (mg/Kg): miligramos/kilogramos

Autores: Castillo, Gutiérrez, Morales, Obregón y Pérez (2021)

Figura 25. Grupos de estudio, Tomada del Bioterio Central de la Universidad de Los Andes.



7. Preparación de las muestras.

Con la ayuda de una espátula se procedió a tomar una porción de cada extracto y se trasvaso a un tubo de ensayo previamente rotulado e identificado, se pesaron los extractos etanólicos por separado (0,01 g c/u) (Figura 26) y se adicionó 1 mL de solución salina fisiológica, luego se agitó por 1 minuto y se observó la solubilidad de cada uno (Tabla 9).

- **Preparación del grupo control**

En los ensayos farmacológicos el grupo control recibió únicamente (0,2 mL) solución salina fisiológica (SSF) (Tabla 9).

- **Preparación del control positivo (Tratamiento)**

El fármaco utilizado como patrón en la actividad farmacológica: Nitrazepam (Vía oral, tabletas con una concentración comercial de 5 mg) y la preparación se realizó de la siguiente manera: Se trituraron 2 tabletas de Nitrazepam en un mortero de porcelana, con la ayuda de una espátula se procedió a tomar los 10 mg de polvo obtenidos y se trasvasó a un tubo de ensayo previamente rotulado e identificado, se adicionó 1 mL de solución salina fisiológica, se agitó por 1 minuto y se observó la solubilidad (Tabla 9).

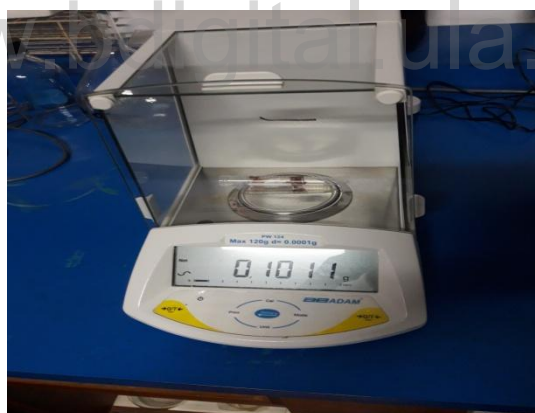
Tabla 9. Preparación de las muestras y grupos controles.

	Peso Extractos (g)	SSF (mL)	Concentración (mg/mL)
Etanol Hojas	0,01	1	10 mg/mL
Etanol Tallos	0,01	1	10 mg/mL
Control		1	
Control positivo (Nitrazepam 5 mg)	0,01	1	10 mg/mL

Leyenda:SSF: Solución salina fisiológica. (g): gramos. (mL): mililitros. (mg/mL): miligramos/mililitros

Autores: Castillo, Gutiérrez, Morales, Obregón y Pérez (2021)

Figura 26. Peso del extracto y control positivo, Tomada en el Centro de Microscopia eletrónica “Dr. Palacios Pru”.



8. Pruebas de conducta

- **Actividad locomotora espontanea:** para este ensayo se utilizó una cámara de actividad locomotora automatizada (Thiruchelvam, Brockel, Richfield, Baggs y Cory, 2000), hecha de una caja de madera abierta de 40 x 40 x 35 cm³, con sensores infrarrojos de movimientos colocados a intervalos de 10 cm, y equipada con contadores digitales (Figura 27). Los animales objeto de

estudio fueron colocados en el centro de la cámara y observados durante un periodo de 5 minutos, registrando el número de veces que el ratón se colocaba en posición vertical (se entiende como una posición vertical cuando el animal se levanta en 2 patas) (Figura 28). El ensayo se realizó con el fin de observar la respuesta de los animales al tratamiento. Después de la observación de cada animal, la superficie de la caja fue limpiada con agua y alcohol.

Figura 27. Cámara de actividad locomotora automatizada, Tomada en el Centro de Microscopia electrónica “Dr. Palacios Pru”.



Figura 28. Posición vertical ratón macho NMRI, Tomada del Bioterio Central de la Universidad de Los Andes.



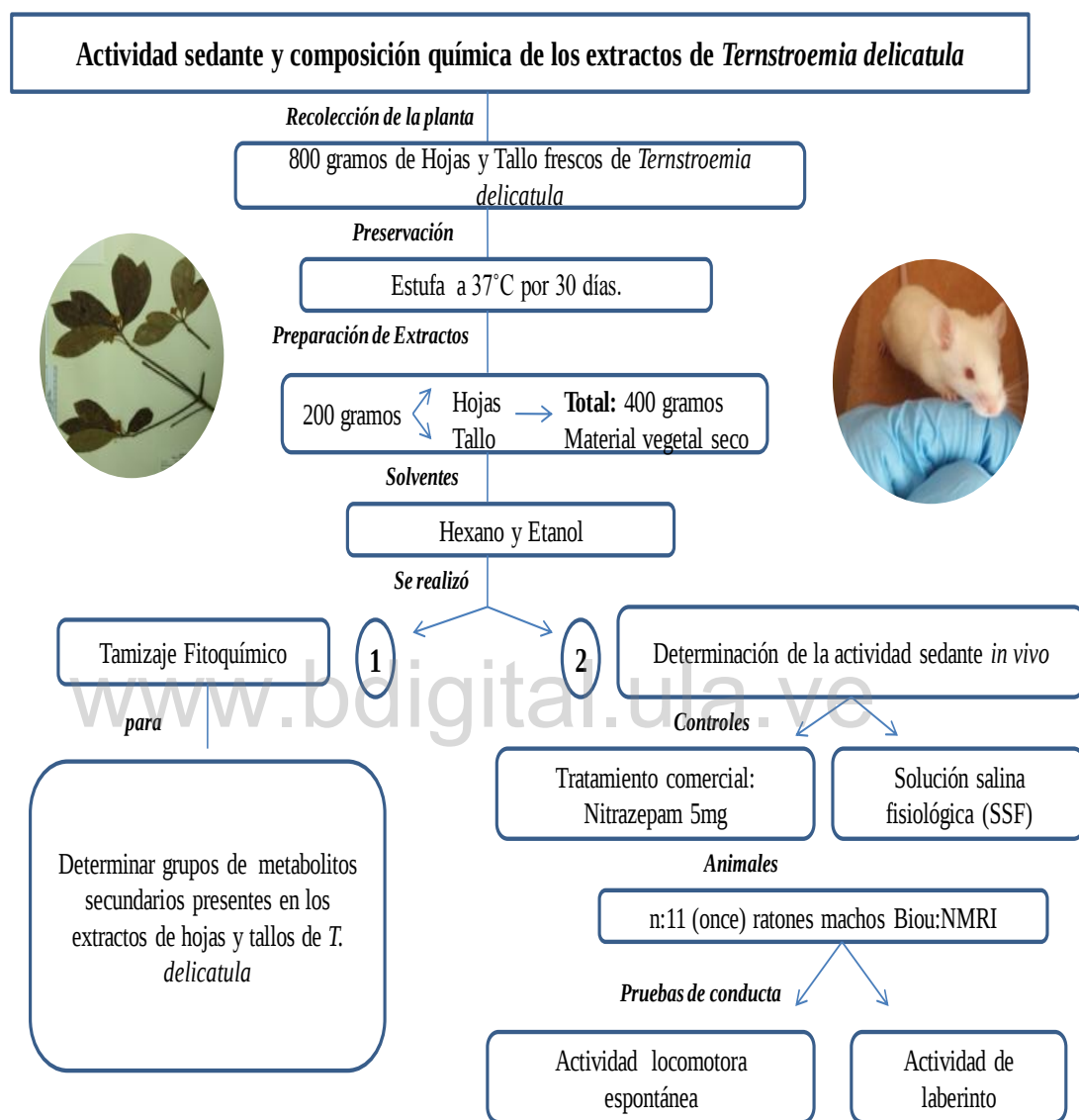
- **Actividad del laberinto:** El ensayo se inició al colocar al animal en el compartimiento de inicio (4 patas dentro del compartimiento inicial), cerrándose tras él la puerta para impedir que el animal volviese a salir. Finalizaba con la llegada del animal al compartimiento de meta (4 patas fuera del compartimiento de salida). El tiempo se controló mediante un cronómetro y el número de veces que el animal llegaba hasta el compartimiento de salida del laberinto, era registrado por las investigadoras mediante observación directa; se consideró que un ratón completaba dicha actividad cuando sus 4 patas estaban dentro de dicho compartimiento (Figura 29). Por tanto, las medidas registradas fueron:
 - ✓ Tiempo (en segundos) de llegada a la meta del animal en cada ensayo.
 - ✓ El número (n) de veces que el ratón completaba la actividad en un periodo de 5 minutos.

www.bdigital.ula.ve

Figura 29. Actividad de Laberinto, Tomada del Bioterio Central de la Universidad de Los Andes.



Esquema 1. Procedimiento de la Investigación.



Elaborada por: Castillo, Gutierrez, Morales, Obregón y Pérez (2021)

Diseño de Análisis

El diseño de análisis del presente estudio se fundamenta en el análisis exploratorio o estadística descriptiva, la cual permite comprender la estructura de los datos a estudiar y los aspectos importantes del fenómeno estudiado. Al respecto el conjunto de datos registrados permitió a través del procesamiento de datos, analizar las variaciones que se presentan en los diferentes grupos de estudio utilizados para el ensayo.

Estos resultados se procesaron mediante un análisis de varianza factorial ANOVA con un 95 % de nivel de confianza ($p < 0,05$). Para observar las diferencias significativas entre los grupos se utilizó la prueba Tukey de comparaciones múltiples. En caso de que no se presente homogeneidad de varianzas en los datos, el análisis se realizó aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Un valor $p \leq 0,05$ se considera estadísticamente significativo. Para todas las pruebas:

H₀: No existe diferencia significativa entre los tratamientos

H_a: Al menos un tratamiento es diferente a los demás.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

1. Estudio fitoquímico de *Ternstroemia delicatula*

En la (Tabla 10) se presentan los porcentajes de rendimiento de cada extracto obtenido para la especie *Ternstroemia delicatula*, el mayor rendimiento se obtiene en los extractos etanólicos, pues estos arrastran la mayoría de los componentes de la planta.

Tabla 10. Porcentaje de rendimiento de la especie *Ternstroemia delicatula*

FRACCIÓN	EXTRACTO	g OBTENIDOS	% DE RENDIMIENTO
Hexano	Hojas	0,83	0,4
	Tallos	0,55	0,27
Etanol	Hojas	12,00	6,0
	Tallos	13,21	6,6

Leyenda: (g): gramos. %: porcentaje.

Autores: Castillo, Gutiérrez, Morales, Obregón y Pérez (2021)

Las pruebas fitoquímicas realizadas con el fin de determinar la presencia de los diferentes grupos de metabolitos secundarios presente en los extractos de hojas y tallos de *Tersntroemia delicatula* permitieron establecer la presencia de triterpenos/esteroles en los cuatro extractos (Figura 30), mientras que en los extractos etanólicos adicionalmente se determinaron compuestos fenólicos, flavonoides y saponinas (Figura 30 y 31) (Tabla 10), estos resultados concuerdan con lo reportado

en la literatura para el género *Ternstroemia* principalmente de especies asiáticas (*Ternstroemia japonica* y *Ternstroemia gymnanther*) donde se han identificado en sus frutos triterpenos (Ikuta y cols, 2003; Shin y Wang, 2003), saponinas (Shin y cols., 2003) y flavonoides (Jo y cols, 2006).

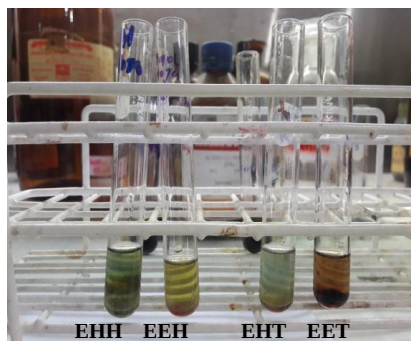
Tabla 11. Resultados obtenidos en las pruebas fitoquímicas de los extractos de *Ternstroemia delicatula*.

PRUEBA QUIMICA	TIPO DE METABOLITOS	EXTRACTO DE HOJAS		EXTRACTO DE TALLOS	
		Hexano	Etanol	Hexano	Etanol
Liebermann-Burchard	Triterpenos/ Esteroles	++ (Verde)	+ (Lig Rojo)	++ (Verde, Lig Rojo)	+ (Verde, Rojo)
Tricloruro férrico (FeCl₃)	Compuestos fenólicos	ND	++ (Verde)	ND	++ (Verde)
Shinoda	Flavonoides	--	++ (Rojo)	--	++ (Naranja, Rojo)
Hidróxido de Amonio (NH₄OH)	Cumarinas	ND	-	ND	-
Ácido sulfúrico (H₂SO₄)	Quinonas	ND	-	ND	-
Hidróxido de Amonio (NH₄OH)	Antraquinonas	ND	-	ND	-
Dragendorff	Alcaloides	ND	-	ND	-
Wagner		ND	-	ND	-
Espuma	Saponinas	ND	++	ND	++
Gelatina	Taninos	ND	-	ND	-

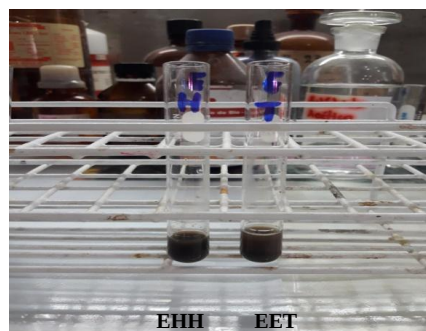
Leyenda: Lig: Ligeramente. **ND:** no determinado. (+): Presente. (-): Ausente. (++) : Abundante

Autores: Castillo, Gutiérrez, Morales, Obregón y Pérez (2021)

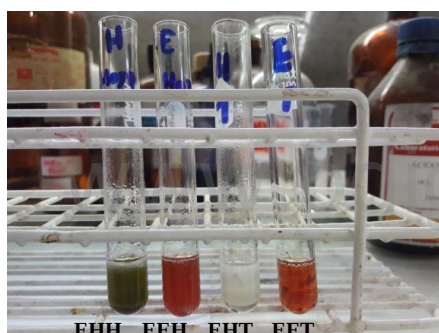
Figura 30. Pruebas fitoquímicas realizadas a los extractos de hojas y tallos de *Tersntroemia delicatula*.



Reacción de Liebermann-Burchard
Triterpenos / Esteroles



Reacción de Tricloruro Férrico (FeCl_3)
Compuestos Fenólicos



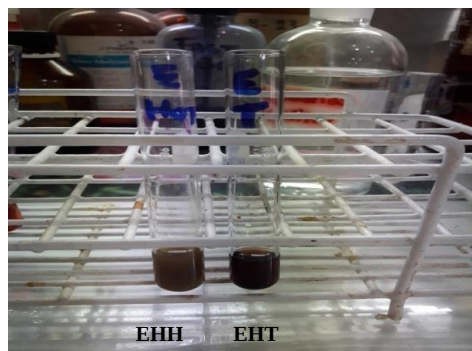
Reacción de Shinoda
Flavonoides



Reacción de Hidróxido de Amonio (NH_4OH)
Cumarinas

EHH: Extracto de Hexano hoja. **EEH:** Extracto de Etanol hoja. **EHT:** Extracto de Hexano tallo.
EET: Extracto de Etanol Tallo. **C (+):** Control positivo

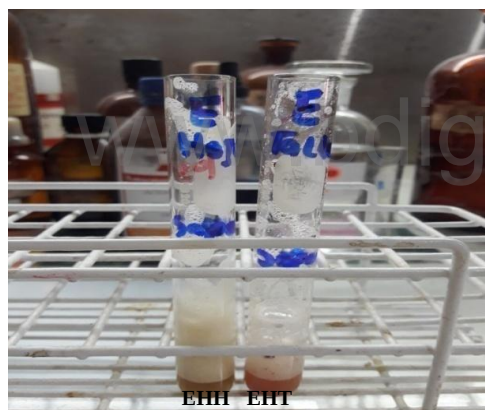
Figura 31. Pruebas fitoquímicas realizadas a los extractos de hojas y tallos de *Tersntroemia delicatula*



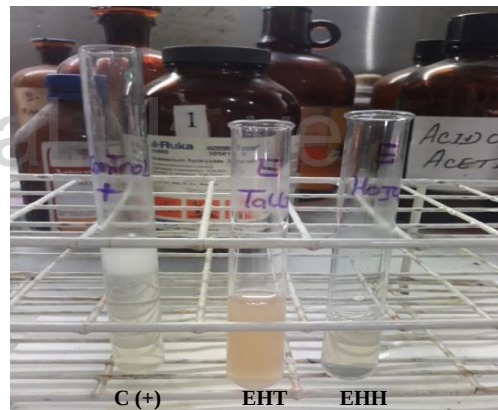
Reacción de Hidróxido de Amonio (NH_4OH)
Antraquinonas



Reacción de Dragendorft y Wagner
Alcaloides



Reacción de Espuma
Saponinas



Reacción de la Gelatina
Taninos

Leyenda: EHH: Extracto de Hexano hoja. EEH: Extracto de Etanol hoja. EHT: Extracto de Hexano tallo. EET: Extracto de Etanol Tallo. C (+): Control positivo. EEHD: Extracto de Etanol hojas Dragendorft. EEHW: Extracto de Etanol Wagner. EETD: Extracto de Etanol tallo Dragendorft. EETW: Extracto de Etanol tallo Wagner

En el caso del análisis de los extractos de *T. delicatula* al realizar las pruebas fitoquímicas correspondientes no fue posible establecer la presencia de taninos que han sido reportados para algunas especies del género (Tori y Fukuyama, 2005).

2. Dosis letal media (DL₅₀)

Se observaron los animales de experimentación estrictamente durante 72 horas, esperando hasta 3 días después de la administración para observar si se dio la muerte de algún animal. En algunos casos la muerte puede ser instantánea o pocos minutos después de administrar la dosis. Los signos precursores de muerte pueden ser: Temblores, sialorrea, sudores, espasmos respiratorios, convulsiones (Hernández y Saravia 1995).

Durante la evaluación toxicológica de las hojas y tallos de *Ternstroemia delicatula*, no se elucido exactamente cuál era (DL₅₀) en virtud que no se observó ningún ratón muerto durante el ensayo (Tabla 12).

Tabla 12. Evaluación toxicológica de los extractos de *T. delicatula*

Extracto	Dosis	N° de muertes después de 3 días
Hojas	5 mg/Kg	0
Tallos	5 mg/Kg	0
Hojas	160 mg/Kg	0
Tallos	160 mg/Kg	0

N°: Número.

Autores: Castillo, Gutiérrez, Morales, Obregón y Pérez (2021)

3. Actividad sedante *in vivo*

Para evaluar la actividad de tipo sedante se emplearon 11 ratones machos Biou: NMRI con un peso promedio obtenido entre 20 y 25 g. El esquema de tratamiento se realizó de la siguiente manera: La administración se realizó por vía oral (0,2 mL) (Figura 32) con un intervalo de tiempo de 10 minutos entre cada grupo de estudio durante 3 días consecutivos de tratamiento cada 24 horas. Las pruebas de conducta se realizaron 15 minutos posteriores a la administración. Los ratones fueron colocados al azar por el personal del bioterio y las observaciones fueron hechas sin conocimiento previo por parte de las investigadoras de las condiciones

experimentales aplicadas a los animales con el fin de comprobar la exactitud de las dosis aplicadas a cada grupo.

Figura 32. Administración de Tratamiento vía Oral, Tomada del Bioterio Central de la Universidad de los Andes.



✓ ***Actividad locomotora espontanea:***

En cuanto a los posibles efectos sedantes de *T. delicatula* en la prueba de actividad locomotora espontanea se encontró una disminución del tiempo de latencia dependiente de la concentración, comparando el grupo A (control SSF) con el grupo G (extracto etanólico de los tallos a la dosis máxima usada 160 mg/Kg) (Tabla 12).

Tabla 13. Resultados de la actividad locomotora espontanea en ratones Biou: NMRI, al administrar diferentes dosis de extractos de *Ternstroemia delicatula*.

	N	Total de Posiciones Vertical	Media	Desviación típica	Error típico	Mínimo	Máximo	P-valor
Grupo A (Control)	3	129	43,00	6,083	3,512	39	50	
Grupo B (Hoja:5 mg/Kg)	6	183	30,50	5,541	2,262	21	36	
Grupo C (Tallo:5 mg/Kg)	6	204	34,00	3,162	1,291	30	37	
Grupo D (Trat: Nitrazepam: 5mg/Kg)	6	144	24,00	12,712	5,190	1	36	0,016 (**)
Grupo F (Hojas:160 mg/Kg)	6	176	29,33	8,477	3,461	18	40	
Grupo G (Tallo:160 mg/Kg)	6	119	19,83	12,513	5,108	3	36	
Total	33	955	28,94	10,656	1,855	1	50	

Leyenda: Trat: Tratamiento, N: número total de mediciones durante los tres días de tratamiento.

Media: número de levantamientos verticales por cada grupo de estudio durante los tres días de tratamiento

Nota: (**) existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los promedios según ANOVA de un factor (95 % de significancia).

Autores: Castillo, Gutiérrez, Morales, Obregón y Pérez (2021)

Análisis de Resultado

Se realizó contrastes de hipótesis a un nivel de confianza del 95 %, determinándose durante el ensayo que a medida que aumenta la dosis del extracto de tallos de *T. delicatula* (Grupo G: 160 mg/Kg) el tiempo de latencia disminuía (pérdida del reflejo de enderezamiento). Sustancias con actividad sedante disminuyen el tiempo de latencia (Vogel, 2008) presentando una mejor respuesta a la dosis más alta, la cual es comparable con la presentada por el fármaco utilizado como grupo de tratamiento (Grupo D tratamiento: Nitrazepam) y el grupo A control (SSF) como se muestra en el gráfico N° 1. Por otro lado, los grupos correspondientes a los extractos de las hojas de *T. delicatula* para

las dosis de 5 mg/Kg, 160mg/Kg y el grupo de los tallos a dosis 5 mg/Kg presentaron un aumento en el tiempo de latencia (mayor número de levantamientos verticales) si se compara con el grupo A control (SSF), manifestando una conducta ansiosa de acuerdo a lo observado experimentalmente en el test.

✓ *Actividad de Laberinto*

Por su parte la actividad de laberinto en este estudio no mostró un efecto estadísticamente significativo, aunque los extractos de las hojas y tallos de *T. delicatulas* a la dosis empleadas se comportaron de manera similar al control positivo (Nitrazepam) en los parámetros evaluados, ninguna de las dosis presentó una estadística significativa (Tabla 13) y (Tabla 14).

Tabla 14. Resultados de la prueba recorrido del Laberinto por los ratones Biou:NMRI luego de aplicar diferentes dosis de extractos de *Ternstroemia delicatula* durante un periodo de 5 minutos.

	N	Total de recorridos laberinto	Media	Desviación típica	Error típico	Mínimo	Máximo	P-valor
Grupo A (Control)	3	8	2,67	0,577	0,333	2	3	0,965
Grupo B (Hoja:5 mg/Kg)	6	15	2,50	1,378	0,563	1	4	
Grupo C (Tallo:5 mg/Kg)	6	16	2,67	0,516	0,211	2	3	
Grupo D (Trat: Nitrazepam 5 mg/Kg)	6	15	2,50	1,049	0,428	1	4	
Grupo F (Hojas:160 mg/Kg)	6	14	2,33	0,816	0,333	1	3	
Grupo G (Tallo:160 mg/Kg)	6	13	2,17	1,329	0,543	0	4	0,965
Total	33	81	2,45	0,971	0,169	0	4	

Leyenda: Trat: Tratamiento. N: número total de mediciones durante los tres días de tratamiento.

Media: número de veces que los ratones completaban el Laberinto durante los tres días de tratamiento

Autores: Castillo, Gutiérrez, Morales, Obregón y Pérez (2021)

Tabla 15. Tiempo en segundos de llegada a la meta de los ratones Biou: NMRI, luego de aplicar diferentes extractos de *Ternstroemia delicatula* en el modelo Laberinto, durante un periodo de 5 minutos.

	N	Total tiempo (segundos)	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	P-valor
Grupo A (Control)	6	785	130,83	92,303	22	261	
Grupo B (Hoja:5mg/Kg)	15	1651	110,07	67,368	5	220	
Grupo C (Tallo:5mg/Kg)	16	1922	120,13	86,966	23	270	
Grupo D (Trat: Nitrazepam :5mg/Kg)	15	1886	125,73	90,890	10	292	0,989
Grupo F (Hojas:160 mg/Kg)	14	1816	129,71	82,264	15	288	
Grupo G (Tallo:160 mg/Kg)	13	1650	130,83	79,000	20	269	

Leyenda: **Trat:** Tratamiento. **N:** número total de mediciones durante los tres días de tratamiento.

Media: tiempo en segundos que los ratones completaban el Laberinto durante los tres días de tratamiento

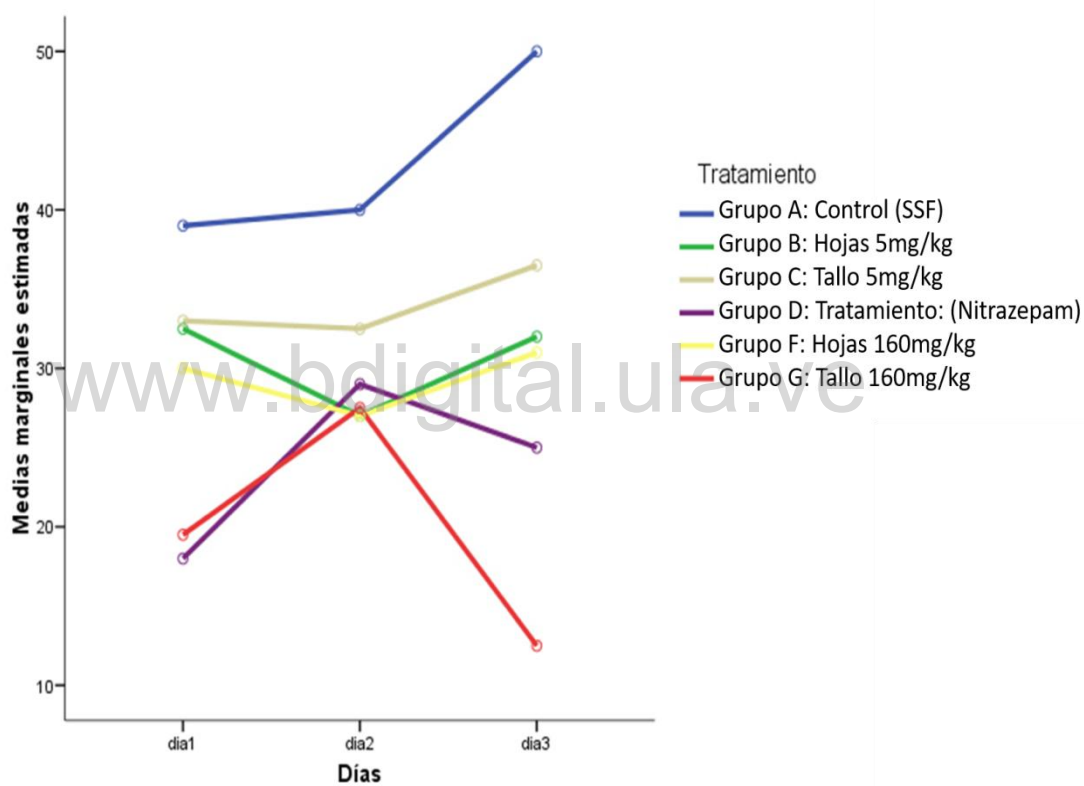
Autores: Castillo, Gutiérrez, Morales, Obregón y Pérez (2021)

Análisis estadístico de resultados

En el Grafico 1 se evidencia que los extractos administrados a los grupos B, C y F en la prueba de actividad locomotora espontanea el numero de levantamientos verticales permanecen constantes durante el tiempo de ensayo en los animales de experimentación, sin variación significativa. Por su parte los extractos de los grupo G y D muestran en común un comportamiento similar y evidencia la menor variación del número de levantamientos (disminución de movimientos verticales) en comparación con el grupo A (SSF) en el cual las variaciones tienen una tendencia al

aumento de movimientos verticales durante los 3 días de tratamiento. A su vez, el extracto grupo G demuestra un grado superior de inhibición en la actividad locomotora con una pendiente más significativa demostrando que se ve afectado el número de movimientos verticales (medidas marginales estimadas) en los ratones a lo largo del tiempo.

Grafico 1. Tratamiento con diferentes concentraciones de extractos de *T. delicatula* en la prueba de actividad locomotora espontanea.

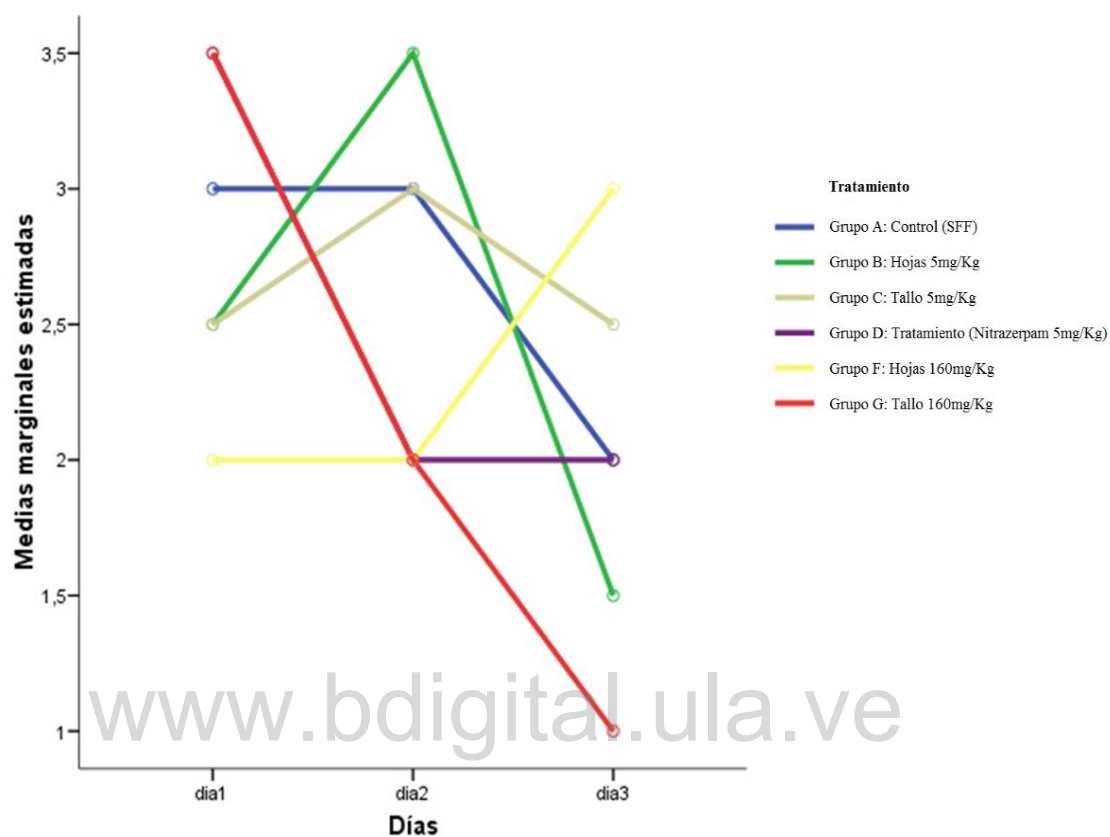


Leyenda: Eje Y: Medidas marginales estimadas: Número de movimientos verticales en el modelo actividad locomotora espontanea; Eje X: Días de tratamiento.

Autores: Castillo, Gutiérrez, Morales, Obregón y Pérez (2021)

En el Grafico 2 no muestran diferencias significativas al comparar los diferentes extractos con el grupo control y el grupo tratamiento observándose un comportamiento similar ($p > 0,05$).

Grafico 2. Tratamiento con diferentes concentraciones de extractos de *T. delicatula* en la prueba de actividad de Laberinto.



Leyenda: Eje Y: Medidas marginales estimadas: Número de veces que los ratones completaban la actividad en el modelo Laberinto; Eje X: Días de tratamiento.

Autores: Castillo, Gutiérrez, Morales, Obregón y Pérez (2021)

Discusión

Los efectos medicinales de las plantas son el resultado de la combinación de varios metabolitos secundarios presentes en éstas, los cuales a través de acciones aditivas o sinérgicas pueden actuar en diferentes objetivos asociados a procesos fisiológicos (Briskin, 2000). Así, en el estudio fitoquímico preliminar que se observa en la Tabla 10, se halló la presencia de metabolitos secundarios como triterpenos, flavonoides y saponinas, los cuales coinciden con lo reportado en la literatura para el género. La presencia de saponinas y triterpenos ha sido reportado en otras especies del género *Ternstroemia* (Shin y col., 2003). Se ha comprobado que este tipo de compuestos tienen actividad en el Sistema Nervioso Central (Ren, Luo, Li, Zuo y Wu, 2006).

Así mismo estos metabolitos individualmente o en combinación son los responsables de los resultados farmacológicos en el presente estudio, como los realizados mediante la actividad locomotora espontanea, el cual permite estudiar: la pérdida de reflejo de enderezamiento del animal, permitiendo durante este ensayo una evaluación de la actividad estimulante o sedativa de un principio activo, por lo cual demostró una estadística significativa ($p < 0,05$) en el grupo G (Extracto de tallo: 160 mg/kg) en comparación con grupo A (control: SSF) según Tukey (2019)

En la actividad de laberinto la cual es una prueba que se utiliza para evaluar el uso de la memoria y la capacidad de aprender y recordar el camino a través del laberinto puede verse afectada por la administración de ciertos fármacos que actúen sobre receptores gabaérgicos en la región de hipocampo, cuya función es el aprendizaje y la memoria a larga y corto plazo, es por ellos que mediante esta prueba se pudo evaluar el efecto de fármacos sobre el aprendizaje y la memoria de los ratones (Vidal, Aguilar, Miñarro y Rodríguez-Arias, 2012), durante dicho ensayo no se mostró una estadística significativa ($p > 0,05$) para los dos parámetros evaluados en esta actividad: (a) Tiempo (en segundos) de llegada a la meta del animal en cada ensayo y (b) El número de veces que el ratón completaba la actividad en un periodo de 5 minutos.

De esta manera se determina que el grupo G (extracto de tallo: 160 mg/kg) fue el que generó una respuesta más efectiva de acuerdo a los parámetros medidos, presentando una disminución de la capacidad motora, teniendo un mayor efecto sedante y ansiolítico debido al efecto sinérgico de los compuestos que actúan uniéndose al receptor GABA_A, potenciando el efecto sedativo en los animales de experimentación en comparación con el grupo A control (SSF).

Varias especies de *Ternstroemia* que crecen en México, comúnmente conocida como "Flor de tila", poseen efectos ansiolíticos, sedantes y anticonvulsivos (Tortoriello y Romero, 1992; Aguilar y Tortoriello 1996). Extractos acuosos de frutos secos de *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standl, sinónimo *Ternstroemia lineata* (Kobuski, 1942; Bartholomew y McVaugh, 1997) y *Ternstroemia sylvatica*, que son las dos principales especies de *Ternstroemia* utilizadas en México como medicina tradicional para reducir el insomnio y el temor (Molina, Contreras, Téllez y Rodríguez, 1999). Los estudios farmacológicos han demostrado que *Ternstroemia pringlei* (Aguilar y Tortoriello, 1996) y *Ternstroemia sylvatica* (Molina y cols., 1999) producen efectos sedantes en ratas.

El trabajo presentado es la primera evidencia de actividad sedante de los extractos obtenidos a partir de los tallos y hojas de *T. delicatula*, esto abre las puertas a la investigación de otras especies Venezolanas que cuenten con pocos estudios o que aún no hayan sido estudiadas.

En el caso de la especie *T. delicatula* no se ha reportado hasta la fecha ninguna prueba farmacológica que justifique su consumo en Venezuela. Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, y con la finalidad de mejorar la calidad de vida de la población, surge el interés en el estudio de dicha especie, a modo de contribuir con una alternativa más segura, económica y al alcance de la población. De allí nace la motivación del presente trabajo, teniendo como objetivo realizar el estudio fitoquímico y evaluar los efectos sedativo de *T. delicatula*, ya que estas actividades han sido reportadas para varias especies del género y esta es la primera vez que se reporta para el género que se encuentra en Venezuela.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

➤ Los extractos de *T. delicatula* presentaron los siguientes rendimientos: 0,4 y 6,0 % para los extractos de hexano (0,83g) y etanol (12 g) de las hojas. Por otra parte, los extractos de hexano (0,55 g) y etanol (13,21 g) de los tallos tuvieron un rendimiento de 0,27 y 6,6 % respectivamente. El extracto de etanol presentó el mejor rendimiento y mostró en el análisis fitoquímico preliminar metabolitos secundarios relacionados con los efectos farmacológicos reportados para este género.

➤ Se encontró que los cuatro extractos de *T. delicatula* presentan: triterpenos/esteroles. El extracto de etanol presenta, además: compuestos fenólicos, flavonoides y saponinas. Los metabolitos identificados cualitativamente caracterizados y aislados en la especie *T. delicatula* concuerdan con lo reportado en la literatura para las especies de este género.

➤ En la determinación de la dosis letal media (DL₅₀) se establece que la toxicidad de los extractos etanólicos de las hojas y tallos de *T. delicatula* es alta debido a que carecen de efectos tóxicos a dosis menores o iguales a 160 mg/kg.

➤ Durante el ensayo de actividad locomotora espontánea el extracto etanólico de los tallos grupo G a dosis: 160 mg/kg presentó actividad de tipo sedante. Estas actividades ya han sido reportadas para varias especies del género y esta es la primera vez que se reporta para el género *T. delicatula*. Por su parte, para los grupos B, C y F no se confirma ninguna actividad de tipo sedante en esta prueba.

➤ En cuanto a la actividad de Laberinto, los extractos etanólicos de las hojas y tallos de *T. delicatula* se comportan de manera similar al control positivo

(Nitrazepam) comparando los resultados del ensayo en base al tiempo que demoran los ratones en hacer el recorrido, lo cual es indicio que presentan actividad de tipo sedante. Aunque no mostró resultados estadísticamente significativos en los parámetros evaluados, sin descartar que pueda tener un mejor efecto a dosis diferentes a las utilizadas en este estudio.

Recomendaciones

- Es necesario realizar más investigaciones con el fin de establecer la seguridad del extracto, los metabolitos responsables de la actividad y el mecanismo de acción a través del cual esta especie ejerce los efectos ya mencionados.
- Evaluar flores y frutos de *T. delicatula* y compararla con los resultados obtenidos para diferentes géneros de *Ternstroemia* que han reportado actividad sedante en estas partes de la planta.
- Utilizar un mayor número de animales por grupo de estudio para garantizar una mayor confiabilidad del ensayo
- A futuros investigadores que garanticen que los animales de experimentación pertenezcan a la misma camada y reúnan los requisitos de edad, peso corporal y tallas similares para que se asegure la autenticidad de los resultados obtenidos durante la investigación
- A las autoridades correspondientes velar por el acondicionamiento del área de ensayos del Bioterio como climatización de las áreas, que permitan evitar estrés en los animales de experimentación, para garantizar la calidad de resultados obtenidos en estudios de esta índole
 - En cuanto al estudio farmacológico, se recomienda implementar ensayos que permitan determinar los posibles mecanismos de acción de los extractos. Además, evaluar la actividad de los compuestos puros.
 - Continuar con investigaciones de especies vegetales medicinales para la validación de su utilidad como una alternativa fitomedicinal para personas de escasos recursos.

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Aguilar, L., y Tortoriello, J. (1996). Anticonvulsant and sedative effects of crude extracts of *Ternstroemia pringlei* and *Ruta chalepensis*. *Phytotherapy Research*, 10(6): 531-533.
- Ancoli, S. (2000). Insomnia in the elderly: a review for the primary care practitioner. *Sleep*, 23(S1):S23-38.
- Arias, F. (2006). *El Proyecto de Investigación: Introducción a la Metodología Científica*. 5ª Ed. Caracas-Venezuela, Editorial Episteme. 57-56, 63-64.
- Arias, F. (2012). *El Proyecto de Investigación. Introducción a la metodología científica*. 6ta ed. Caracas, Venezuela: Editorial Epísteme.
- Atanasov, A., Waltenberger, B., Pferschy, E., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Stuppner, H., Temml, V., Wanga, L., Schwaiger, S., Heiss, E., Rollinger, J., Schuster, D., Breuss, J., Bochkov, V., Mihov, M., Kopp, B., Bauer, R., y Dirscha, V. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33: 1582-1614.
- Azuola, R., y Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en Marcha*, 20(4): 30-40.
- Balderas, J., y Reza, V. (2008). Pharmacodynamic interaction of the sedative effects of *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standl. with six central nervous system depressant drugs in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(1): 47-52.
- Balderas, J., Alfaro, A., Monroy, A., López, E., Rivero, F., y Navarrete, A. (2013). Toxic rather than neuropharmacological effect of *Ternstroemia sylvatica* fruits and identification of 28-O- $[\beta$ -l-6-rhamnopyranosyl]-R1- barrigenol as a new compound with toxic effects in mice. *Pharmaceutical Biology*, 51(11): 1451-1458.
- Balunas, M., y Kinghorn, A. (2015). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78: 431-441.

- Bartholomew, B., y McVaugh, R. (1997). Identification and Typification of *Ternstroemia lineate* de Candolle (Theaceae). Pp. 14-16
- Benavides, F., y Guenét, J. (2003). Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones. Edición SECAL. Universidad de Alcalá - España. 312 pp.
- Belelli, D., y Lambert, J. (2005). Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA_A receptor. *Nature Reviews Neuroscience*, 6:565-75.
- Bobes, J. (1992). No te rindas ante los trastornos del sueño. Universidad de Oviedo-España. Ediciones Rialp.
- Bonilla, J. (2013). Determinación de la toxicidad, actividad sedante y ansiolítica del extracto acuoso de las Flores de *Erythrina berteroana* (Pito) en ratones NIH. Revista de la Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia, 19(4): 383-398. Disponible en:http://ri.ues.edu.sv/3259/1/161_03226.pdf.
- Bonilla, J., y Saravia A. (2003). Validación farmacológica de las acción sedante e hipnótico de las hojas de *Passiflora edulis* (granadilla o flor de la pasión) de las hojas de *Pelargonium hortorum* (geranio) y de las hojas de *Hypericum perforatum* (hipérico). Estudio de tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Guatemala, Pp. 1-58.
- Bormann, J. (2000). The ABC of GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21:9-16.
- Bowery, N., Doble, A., y Hill, D. (1981). Bicuculline-insensitive GABA receptors on the peripheral autonomic nerve terminals. *European Journal of Pharmacology*, 71:53-70.
- Brandstrup, K., y Reina, C. (2013). Sedantes, Analgésicos y Relajantes Musculares. Sociedad y fundación española de cuidados intensivos pediátricos. SECIP: [En línea]. Disponible en: <http://secip.com/wp-content/uploads/2018/06/Protocolo-Sedoanalgesia-y-Relajaci%C3%B3n.pdf>.
- Brenner, G., y Stevens C. (2018). *Farmacología básica*. 5th Edition. USA 576 pp.
- Briskin D. (2000). Medicinal plants and phytomedicines - linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*; 124: 507-514

- Brunton, L, Lazo, S, y Parker, L. “Goodman & Gilman. (2006). Las bases farmacológicas de la Terapéutica”. Undécima Edición. McGraw Hill.
- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales. 2ª edición. Zaragoza, España: Acribia. 1100 pág.
- Bucciarelli, A., Jouglard, E., Mancini, O., Lloret, R., Rubio, A., y Skliar, M. (2010). *Perspectivas del uso de productos fitoterápicos en el tratamiento del insomnio, la ansiedad y desordenes relacionados*. (Tesis de grado). Argentina: Universidad Nacional del Sur.
- Buysee, D., Reynolds, C., Kupfer, D., Thorpy, M., Bixler, E., y Manfredi, R., Kales, A., Vgontzas, A., Stepanski, E., Roth, T., Hait, P., Mesiano, D. (1994). Clinical diagnosis in 216 insomnia patients using the International Classification of Sleep Disorders (ICSD), DSM-IV, and ICD-10 categories: a report from the APA/NIMH DSM-IV field trial. *Sleep*, 17: 630-637.
- Carlson, N. (2008). Foundations of physiological psychology, Boston: MA, Allyn & Bacon ed. (7a. Ed.).
- Carvajal, L., Uribe, Y., Sierra, N., y Rueda, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos Schultesia* Krukoff). *Colombia Forestal*, 12: 161-170.
- Cedamos, P. (2019). *Medición de amoníaco en jaulas de ratones (Mus musculus) Optimice mediante las tiras reactivas Hydrion de Micro Essential Lab*. (Tesis de grado). Perú: Universidad Ricardo Palma
- Cheek, M., Haba, P., Konomou, G., y Van Der Burgt, X. (2019). *Ternstroemia guineensis* (Ternstroemiaceae), a new endangered cloudforest shrub with neotropical affinities from Kounounkan, Guinea, W Africa. *Willdenowia*, 49(3): 351-360.
- Chinou, I. (2008). Primary and secondary metabolites and their biological activity. En: Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T (Eds) Thin layer chromatography in phytochemistry. Boca Raton: CRS Press; pp. 59-76.
- Clavijo, N., y Cruz, B. (2017). Análisis fitoquímico preliminar de *Pachira quinata* (Jacq.) W.S. Alverson, Bogotá, Colombia. *Boletín Semillas Ambientales*, 11(1): 30-39.

- Concepción, M. (2010). *Investigaciones científicas. Metabolitos de las plantas*. Universidad República Dominicana. 85 pág.
- Conde, V., y Martínez, M. (1990). Algunos aspectos farmacológicos clínicos de las azaspirodecanodionas. *Farmacología del SNC*, 4: 85-102.
- Datta, S. (2010). Cellular and Chemical neuroscience of mammalian sleep. *Sleep Medicine*, 11(5):431-40.
- De Osorio, A. (2006). Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel. Una responsabilidad y un compromiso ético que nos compete a todos. *Revista Colombiana de Bioética*, 1(1):163- 183.
- Diekelmann, S., y Born, J. (2010). The memory function of sleep. *Nature Reviews Neuroscience*, 11:114-26.
- Domínguez, X. (1979). *Métodos de investigación fitoquímica*. Editorial Limusa. 280 pág.
- Dueñas, M., Hernández, T., Estrella, I., y Rabanal, R. (2003). Phenolic composition and antioxidant activity of mocan seeds (*Visnea mocanera* L.f). *Food Chemistry*, 82 (3): 373–379.
- Enna, S., y Möhler, H. (2007). *The GABA receptors*, 1a. Ed. Humana Press Inc: Totowa, New Jersey.
- Egwaikhide, P., Okeniyi, S., y Gimba, C. (2009). Screening For Anti-microbial Activity and Phytochemical Constituents Of some Nigerian Medicinal Plants. *Journal of Medicinal Plants*, 3(12): 1088-1091.
- Fernández, B., e Iglesias, I. (1997). El insomnio, tratamiento farmacológico y no farmacológico (I). *Revista Acofarma*, (359): 36-8.
- Frei, B., Baltisberger, M., Sticher, O., y Heinrich, M. (1998). Medical ethnobotany of the zapotecs of the isthmus-sierra (Oaxaca, Mexico): documentation and assessment of indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 62: 149-165.
- Fuentes, Fl., Mendoza, R., Rosales, A., y Cisneros, R. (2008). Guía de manejo y Cuidado de animales de Laboratorio: ratón. Centro Nacional de Productos Biológicos Instituto Nacional de Salud. Lima-Perú.

- Gallegos, R. y Castillo, G. (2015). Modelos animales de miedo y ansiedad: descripciones neuro-conductuales. [En línea]. [Consulta: 20 de septiembre 2018]. Disponible en: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/actualidades/article/view/14595/17243>.
- García, J. (2013). Los sueños: psicología y fisiología. Miembro del equipo de Psicoterapeutas.com. Centro de Psicología Clínica y Psicoterapia.
- Gao, H., Liu, B., Liu, F., y Chen, Y. (2010). Anti-proliferative effect of camellianin A in *Adinandra nitida* leaves and its apoptotic induction in human Hep G2 and MCF-7 Cells. *Molecules*, 15(6): 3878-3886. Doi: 10.3390/molecules15063878
- Gago, F. (2019). Introducción a la farmacología experimental. Área de Farmacología. Departamento de Ciencias Biomédicas. Universidad de Alcalá.
- González, Y. (2011) Taninos de diferentes especies vegetales en la prevención del fotoenvejecimiento. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 20(1): 16-20.
- Gorry, E. (2008). Revisión de los efectos ansiolíticos sedante e hipnótico del tilo. <http://www.biol.unlp.edu.ar/farmacologia/Utiles/Tilo.pdf>.
- Grande, J. (2018). Sertulum Ternstroemiacearum II: *Ternstroemia tepuiensis* J.R.Grande, sp. nov. (Ternstroemiaceae), especie nueva del Escudo Guayanés. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 75(1): 1-7
- Haefely, W. (1989). Benzodiazepines. Mechanisms of action. En: Antiepileptic Drugs. 3.a ed. RH Levy, FE Dreifuss, RH Mattson, BS Meldrum y JK Penry, eds. Raven Press. New York; pp 721-734.
- Hastings, M., O'Neill, J., y Maywood, E. (2007). Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *Journal of Endocrinology*, 195(2):187-98.
- Haro, R., Labra, A., y Sánchez, F. (2010). Repercusiones médicas, sociales y económicas del insomnio. *El residente*, 5(10): 130-138.
- Hedrich, H. (2012). *The Laboratory Mouse*. Second Edition. Alemania: Hannover
- Heller, A., Beneke, M., Kuemmel, B., Spencer, D., Kurts, N., (1990). Ipsapirone: Evidence for efficacy in depression. *Psychopharmacol. Bull*; 26: 219-222.
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación*. 6ta ed. Distrito Federal, México: McGraw-Hill.

- Hernández, M., López, R., Rabanal, R., Dariasa, V., y Arias, A. (1994). Antimicrobial activity of *Visnea mocanera* leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 41(1-2): 115-119.
- Hernández, M., Saravia, A. (1995). Estudio farmacológico de los extractos polar, medianamente polar y apolar de *gnaphalium stramineum* (sanalotodo) como antiinflamatorios (estudio farmacológico de fase ii). Guatemala. Pp. 1-92.
- Hobson, J., y Pace-Schott, E. (2002). The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems, consciousness and learning. *Nature Reviews Neuroscience*, 3:679-93.
- Huang, H., Ko, H., Jin, Y., Yang, S., Shih, Y., y Chen, I. (2012). Dihydrochalcone glucosides and antioxidant activity from the roots of *Anneslea fragrans* var. *lanceolata*. *Phytochemistry*, 78: 120–125.
- Ikuta, A., Tomiyasu, H., Morita, Y., y Yoshimura, K. (2003). Ursane and oleanane type triterpenes from *Ternstroemia gymnanthera* callus tissues. *Journal of Natural Products*, 66: 1051-1054.
- Inada, A., Maki, F., Kakimoto, L., Fusako, K., Toya, N., Yuco, M. (1989). Estructura de un nuevo glucósido flavonoide acilado, eurianosido de flores de Eruya Japónica THUNB. J-Stage Química Farmaceutica Volumen 37 N:10
- Iwakawa, T., Tanaka, Y., y Takashima, A. (2001). A New Galloylglucoside from *Cleyera ochracea* DC. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49(11): 1498-1499.
- Jo, Y., y Suh, J. (2005). Jacaranone and related compounds from the fresh fruits of *Ternstroemia japonica* and their antioxidative activity. *Archives of Pharmacol Research*, 28: 885-888.
- Jo, Y., Kim, M., Shin, M., Chung, H., Jung, J., y Im, K. (2006). Antioxidative Phenolics from the Fresh Leaves of *Ternstroemia japonica*. *Journal of Natural Products*, 69: 1399-1403.
- Kikuchi, K. y Yamaguchi, M. (1974). The structure of *Ternstroemia xantina*, A new aldehydic C40–carotenoid. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 47, 885–887.
- Kim, J., Kim, S., Hyun, C., y Lee, N. (2012). Antioxidative chemical constituents from the stems of *Cleyera japonica* Thunberg. *International Journal of Pharmacology*, 8(5): 410-415.

- Kim, J., Oh, T., Hyun, C., y Lee, N. (2014). Tyrosinase inhibitory chemical constituents from *Cleyera japonica* Thunberg. *Branches Records of Natural Products*, 8(3): 303-306.
- Klein, R., Mascia, M., y Harkness, P. (1995). Regulation of allosteric coupling and function of stably expressed GABA_A receptors by chronic. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 274:1484-92.
- Kobuski, C. (1942). Studies in the Theaceae. XIII Notes on the Mexican and American species of *Ternstroemia*. *Journal of the Arnold Arboretum* 23, 464-478.
- Korolkovas, A., y Burckhalter, J. (1983). Compendio esencial de Química farmacéutica [Internet]. España; Madrid: Reverte, [Citado 04 febrero del 2018]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=LFwAqUISb2UC&pg=PA125&dq=sedante&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwjggqzN_7HZAhWHzlMKHbDOAHQQ6AEIKzAB#v=onepage&q=sedante&f=true.
- Lairer, F., Peña, V., y Vélez, F. (1942). *Farmacopea de los Estados Unidos de Venezuela*. Caracas-MCMXLII. 118-119 pág.
- Llados, J. (1998). El sueño: características y trastornos. *El farmacéutico*, 213:54-66.
- Lárez, A., y Prada, E. (2014). Estado de Conservación de Algunas Angiospermas en la Planicie Deltaica del Estado Monagas, Venezuela. *Ernistia*, 24(1): 41-68.
- Langer, S., y Arbilla, S. (1991). Selectivity for omega receptor subtypes as a strategy for a novel approach in the development of anxiolytic drugs. En: Biological Psychiatry. G Racagni, N Brunello y TL Fukuda, eds. Excerpta Médica. Amsterdam; 1: 683-685.
- Li, H., Xiao, C., Wang, M., Cui, S., Li, H., Wang, K., Dong, X., y Jiang, B. (2019). Four new phenylethanoid glycosides from *Ternstroemia gymnanthera* and their analgesic activities. *Phytochemistry Letters*, 34: 25-29.
- Linares, E., Flores, B., y Bye, R. (1988). *Selección de Plantas Medicinales de México*. Editorial Limusa, México.

- Liu, B., Ma, Y., Liu, Y., Yang, Z., y Zhang, L. (2013). Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of flavonoids from *Adinandra nitida* leaves. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(6): 1045-1051.
- Liu, B., Yang, J., Ma, Y., Yuan, E., y Chen, C. (2010) Antioxidant and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities of ethanol extract and pure flavonoids from *Adinandra nitida* leaves. *Pharmaceutical Biology*, 48(12): 1432-1438, DOI: 10.3109/13880209.2010.490223.
- Lozada, J., Villarreal, M., Fliniaux, M., Bensaddek, L., Mesnard, F., Gutiérrez, M., y Cardoso, A. (2010). Isolation of jacaranone, a sedative constituent extracted from the flowers of the Mexican tree *Ternstroemia pringlei*. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(2): 551-554.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Caracas: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 440 pág.
- Marion, J., Jansen, J., y Lindeman, J. (1979). *Theaceae*. En: *Flora of Suriname*, 5 Parte 1. Van Eedenfonds, Amsterdam: E.J.Brill. 356-366 pág.
- Markov, D., y Goldman, M. (2006). Normal sleep and circadian rhythms: neurobiologic mechanisms underlying sleep and wakefulness. *Psychiatric Clinics of North America*, 29(4):841-53.
- Medel, J., Cortijo, L., Gasca, E., Susan, P., Pérez, A., y Ramos, F. (2011). Receptor GABA_A: implicaciones farmacológicas a nivel central. *Archivos de Neurociencias*, 16(1): 40-45.
- Mejía, C. (1990). Aproximación a la etnobotánica de los mercados de Iquitos. IV Congreso Internacional de Botánica. La Habana. Cuba. 4 pág.
- Meyer, T. (1998). Evaluation and management of insomnia. *Hospital Practices and Research*, 33; 75-78, 83-86.
- Miranda, D., Conde, C., Celis, S., y Corzo, P. (2009). Modelado del Comportamiento de Ratas en Laberinto en Cruz Elevado Basado en Redes Neuronales Artificiales, 41-42, 406-408.

- Möhler, H., Benke, D., Benson, J., Lüscher, B., Rudolph, U., y Fritschy, J. (1996). Diversity in structure, pharmacology, and regulation of GABAA-receptors. In: The GABA Receptors. 1a. Ed. Humana Press Inc. Totawa, New Jersey.
- Molina, M., Contreras, C., Téllez, P., y Rodríguez, F. (1999). Sedative actions of *Ternstroemia sylvatica* in the male rat. *Phytomedicine*, 6(2): 115-118.
- Moreno, C., Sánchez, A., Vázquez, M., Hernández, A., y García, R. (2017). Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive potential of *Ternstroemia sylvatica* Schltdl. & Cham. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(11): 1047–1053.
- Motooka, R., Usami, A., Nakahashi, H., Koutari, S., Nakaya, S., Shimizu, R., Tsuji, K., Marumoto, S., y Miyazawa, M. (2015). Characteristic odor components of essential oils from *Eurya japonica*. *Journal of Oleo Science*, 64(5): 577-584. Doi: 10.5650/jos.ess14225
- Oh, M., Park, K., Kim, M., Kim, S., y Lee, N. (2013). Three new orcinol-conjugated hydrolysable tannins from the leaves of *Cleyera japonica*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 61(3): 340-343.
- Oh, T., Baik, J., Yoo, E., Kang, H., y Lee, N. (2011). New Phenylpropanoid glycosides from *Eurya emarginata* (Thunb.) Makino. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 32(8): 3175-3178. Doi: 10.5012/bkcs.2011.32.8.3175
- Omar, A., Dibwe, D., Tawila, A., Sun, S., Phrutivorapongkul, A., y Awale, S. (2019). Chemical constituents of *Anneslea fragrans* and their antiausterity activity against the PANC 1 human pancreatic cancer cell line. *Journal of Natural Products*, 82(11): 3133–3139.
- Organización Mundial de la Salud. (2002-2005). Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional. WHO/EDM/TRM/ 2002; 1. Ginebra, Suiza.
- Pace-Schott, E., y Hobson, J. (2002). The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. *Nature Reviews Neurosciences*, 3:591-605.

- Pallo, M. (2012). Evaluación del efecto ansiolítico del extracto hidroalcohólico de flor de Granadilla (*Passiflora ligularis*) en ratones (*Mus musculus*). Tesis de grado previa la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Facultad de Ciencias Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador.
- Park, S., Lee, H., Yoon, Y., Kang, G., Moon, J., Le, N., Kim, S., Kang, H., y Yoo, E. (2005). Inhibitory effects of eutigosides isolated from *Eurya emarginata* on the inflammatory mediators in RAW264.7 cells. *Archives of Pharmacal Research*. 28(11): 1244-1250.
- Park, S., Yang, H., Moon, J., Lee, N., Kim, S., Kang, J., Lee, Y., Park, D., Yoo, E., y Kang, H. (2005). The cytotoxicity of eutigosides from *Eurya emarginata* against HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Archives of Pharmacal Research*, 28(2): 1047-1052.
- Papadopoulos, V. (1991). Hormone-stimulated steroidogenesis is coupled to mitochondrial benzodiazepine receptors. En: Biological Psychiatry. G Racagni, N Brunello y T Fukuda, eds. Excerpta Medica. Amsterdam; 1: 742-743.
- Pérez, E., y Ávalos, A. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*, 2(3): 119-145.
- Pérez, A., y González, A. (2015). Plantas medicinales. [En línea]. 2015. 1(2), pp. 70-71. [Consulta: 22 noviembre 2018.]. Disponible en: https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/66_3/PDF/Ansiedad.pdf.
- Pérez, N., y Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*. 11(49): 195-211.
- Pita, E., y Manzanares, J. (1992). Fármacos ansiolíticos e hipnóticos. *Revista de la Asociación Española de Neuropsiquiatría*. Vol. XII, Suplemento 1, 29-35.
- Plants of the World Online (2018). Vepris. En: Plants of the World Online. Facilitado por Royal Botanic Gardens, Kew. Publicado en http://www.plantsoftheworldonline.org/?f=accepted_names&q=Vepris

- Polanco, L. (2011). Modelos animales: Una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad. [En línea]. [Consulta: 03 diciembre 2018.]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/sumps/v18n2/v18n2a11.pdf>
- Pomillo, A. (2012). Investigación en química de productos naturales en Argentina: vinculación con la bioquímica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 46(1): 73-82.
- Prichard, J., y Ransom, B. (1989). Phenobarbital. Mechanism of action. En: *Antiepileptic Drugs*. 3.a ed. RH Levy, FE Dreifuss, RH Mattson, BS Meldrum y JK Penry, eds. Raven Press. New York; pp 267-282.
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Katz, L., LaMantia, A., y McNamara, J. (2004). *Invitación a la Neurociencia*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Rall, T., y Schleifer, L. (1990). Drugs effective in the treatment of the epilepsies. En: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. A Goodman Gilman, TW Rall, AS Nies y P Taylor, eds. 8.a ed. Pergamon Press. New York; pp 436-462.
- Rausch, J., Ruegg, R., Moeller, F. (1990). Gepirone as a 5-HT_{1A} agonist in the treatment of major depression. *Psychopharmacol Bull*; 26: 169-172.
- Ravizza, L., Patrizia, F., Paola, R., Carola, E., Paolo, B., Nicoletta, R., Enrico, G., Bruno, B. (1991). Lymphocyte peripheral-type benzodiazepine receptors in neuropsychiatric diseases. En: *Biological Psychiatry*. G Racagni, N Brunello y T Fukuda, eds. Excerpta Médica. Amsterdam; 1: pp 750-754.
- REA. (2001). Real Academia de la Lengua Española. *Diccionario de la Lengua Española*. Madrid: Real Academia de la Lengua Española.
- Reddy, A., y O'Neill, J. (2010). Healthy clocks, healthy body, healthy mind. *Trends in Cell Biology*, 20(1):36-44.
- Reinoso, F., De Andrés, I., y Garzón, M. (2011). Functional anatomy of the sleep-wakefulness cycle: wakefulness. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, 208:1-128.
- Rengifo, R. (2013). Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos. *Pharmaciencia*. 1(2): 51-56.

- Ren, L., Luo, Y., Li, X., Zuo, D. y Wu, Y. (2006). Antidepressant-like effects of sarsasapogenin from *Anemarrhena asphodeloides* BUNGE (Liliaceae). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29, 2304–2306.
- Reyes, M., y Saravia A. (1995). Contribución al estudio farmacológico de hojas de *Daucus carota* (zanahoria), *Anethum graveolens* L. (eneldo) y *Achillea millefolium* (Milenrama) de uso popular en Guatemala como sedante e hipnótico. Estudio de tesis para optar al título de Química Farmacéutica. Guatemala. Pág. 75.
- Rickels, K., Robinson, D., Feighner, J., Fabre L., Gammans, E., Shrotriya, R., Alms, D., Andary, J., Messina, M. (1990). Buspirone in depressed outpatients: A controlled study. *Psychopharmacol Bull*, 26: 163-168.
- Ringdahl, E., Pereira, S., y Delzell, J. (2004). Treatment of primary insomnia. *American Board of Family Medicine*, 17: 212-219.
- Rivas, C., Oranday, M., y Verde, M. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. *Omnia Science* (Omnia Publisher SL). 452 pág.
- Roca, Cl. (2005). Evaluación comparativa de la acción sedante e hipnótica de un elixir fitoterapéutico y la combinación de las plantas originales. Universidad De San Carlos De Guatemala. Obtenido de: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2371.pdf.
- Rocabado, G., Gonzáles, E., De La Fuente, E., y Araya, P. (2011). Estudios de la actividad ansiolítica-sedante de la especie *Tagetes minuta* L. *Revista Médica La Paz*, 17(1): 22-25.
- Rosalind, T., Dutta, B., y Paul, S. (2011). Phytochemical screening and antibacterial studies of the leaf extract of *Eurya japonica* Thunb. and *Ficus auriculata* Lour. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 5(2): 909-916.
- Salgado, N., Núñez, P., Acevedo, M., Corona, L., Rodríguez, V., Mesnard, F., Fliniaux, M., Molinié, R., Marcelo, P., Villarreal, M., Toshirrico, A., y Pak, T. (2015). Radical scavenging, antioxidant, and cytotoxic activities of the methanolic

extracts from different organs of *Ternstroemia pringlei*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(6): 2279-2284.

Salgado, D., Salinas, E., Salinas, E., y Núñez, K. (2012). Determinación del Efecto Sedante de mezclas de Extractos a base de *Vetiveria zizanioides*, *Pasiflora edulis*, *Melissa officinalis*, y *Tilia cordata* en ratones Wistar en el periodo comprendido de Abril-Noviembre del 2012. Tesis para optar al título de Licenciado Químico-Farmacéutico. Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua UNAN-León. Nicaragua.

Sanmartín, D. (2012). *Farmacología: Los diferentes tipos de animales en experimentación (y II)*. [En línea]. (Consultado el 11 de abril 2020). Disponible en: <https://www.xatakaciencia.com/biologia/farmacologia-los-diferentes-tipos-de-animales-en-experimentacion-ii>.

Santamaría, D., y Lagomarsino, L. (2015). Cuatro nuevas especies y un nuevo registro de *Freziera* (Pentaphylacaceae) de Ecuador y Perú. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 9(1): 89-102.

Saravia, A. (2004) Manual de ensayos toxicológicos y farmacológicos “in vivo e in vitro”. Editorial Universitaria.

Sarraís, F., y De Castro, P. (2007). El insomnio. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 30(Supl. 1): 121-134.

Saravia, A. (2004). Manual de ensayos toxicológicos y farmacológicos “in vivo e in vitro”. Editorial Universitaria.

Sharapin, N., Machado, L., Souza, E., Rocha De Albuquerque, E., Valverde, E., y López De Almeida, J. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Bogotá: CYTED.

Shepherd, G. (1984). Neurobiology. *Anal. of Neurology. Oxford University Press*, 15(6), 616-617.

Shin, M., y Wang, W. (2003). Triterpenoid saponins from the fruits of *Ternstroemia japonica*. *Journal of Natural Products*, 66(10): 1351-1355.

Simon, G., y Vonkorff, M. (1997). Prevalence, burden, and treatment of insomnia in primary care. *American Journal of Psychiatry*, 154:1417-1423.

- Stevens, P. (2001). Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012. Publicado en <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- Takao, R. y Miyakawa, L. (2006). Luz/oscuridad de transición de prueba para ratones. Pp.11-15. [En línea]. [Consulta: 25 noviembre 2018]. Disponible en: Available at: <https://www.jove.com/video/104/luz-oscuridad-de-transicin-de-prueba-para-ratones?language=Spanish>.
- Talero, C, Durán, F, Pérez I. (2013). Sueño: características generales. Patrones fisiológicos y fisiopatológicos en la adolescencia. *Revista Ciencias de la Salud.*, 11(3):333-48.
- Tamayo, R., Verdecia, A., y Mojera, I. (2011). Tamizaje Fitoquímico de los extractos alcohólicos, etéreo y acuosos de las hojas y tallo de la *Isocarpha cubana* B. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 15(3): 68-74.
- Thiruchelvam, M., Brockel, B., Richfield, E., Baggs, R. y Cory, D. (2000). Potentiated and preferential affects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson`s disease? *Brain Research*. 873(2): 225-234.
- Thorpy, M. (1990). Diagnostic Classification Steering Committee of the America Sleep Disorders Association. International classification of sleep disorders-diagnostic and coding manual. Rochester (MN): American Sleep Disorders Association.
- Tori, M., y Fukuyama, H. (2005). Degraded terpenoids and aromatic compounds from *Ternstroemia gymnanthera*. *Letters in Organic Chemistry*, 2(3): 262-264.
- Tortoriello, J. y Romero, O. (1992). Plants used by Mexican with presumable sedative properties: an ethnobotanical approach. *Archives of Medical Research* 23: 111-116.
- Trópicos. (2014). *Ternstroemia mutis* ex L. f. Supplementum Plantarum; 39(264): 1781-1782. Disponible en: <https://legacy.tropicos.org/Name/BoliviaCatalogue/TernstroemiamitusexLf>.

- Tsou, C., Li, L., y Vijayan, K. (2016). The Intra-familial Relationships of Pentaphylacaceae s.l. as Revealed by DNA Sequence Analysis. *Biochemical Genetics*. 54(3): 270-282. DOI 10.1007/s10528-016-9717-1.
- Tyrer, P. (1988). Current status of β -blocking drugs in the treatment of anxiety disorders. *Drugs*; 36: 775-783.
- Ueda, J., y Kato, J. (1982). Identification of jasmonic acid and abscisic acid as senescence-promoting substances from *Cleyera ochnacea* Dc. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(7): 1976-1976.
- Valcarcel, M., y Gómez, A. (1988). Técnicas analíticas de separación. Editorial Reverte. España. 800 pág.
- Valdivielso, A. (1998). Dolor agudo, analgesia y sedación en el niño (IIIb): Farmacocinética y farmacodinamia de los sedantes. *Anales Españoles de Pediatría*, 48:541-548.
- Vassalli, A., y Dijk, D. (2009). Sleep functions: current questions and new approaches. *European Journal of Neuroscience*, 29:1830-41.
- Velis, A. (1999). Validación de la actividad farmacológica como tranquilizante y/o sedante de *Solanum nigrescens* Mart & Gal. (quilete, macuy o hierba mora). Estudio de tesis para optar al título de Química Farmacéutica. Guatemala. 1999. Pp. 1-45.
- Velluti, R. (1987). Esquema de la fisiología del sueño. *Revista Médica de Uruguay*, 3: 47-57
- Venkatesan, T., Park, E., Choi, Y., Lee, J., y Kim, Y. (2017). Anti-inflammatory activity of *Ternstroemia gymnanthera* stem bark extracts in bacterial lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 murine macrophage cells. *Pharmaceutical Biology*, 55(1): 837–846. Doi: 10.1080/13880209.2017.1278778
- Vidal, A., Aguilar, M., Miñarro, J. y Rodríguez, M. (2012). Effect intermittent exposure to ethanol and MDMA during adolescence on learning and memory in adult mice. *Behavior and Brain Functions*, 8:1-32. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-8-32>

- Viniegra, M., Parellada, N., Miranda, R., Parellada, L., Planas, C., y Momblan, C. (2015). Abordaje integrativo del insomnio en atención primaria: medidas no farmacológicas y fitoterapia frente al tratamiento convencional. *Revista Atención Primaria*, 47(6): 351–358.
- Vogel, H. (2008). *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*. 3ra ed. New York: Springer.
- Weitzmann, A., Dressler, S., y Stevens, P. (2004). Ternstroemiaceae. Pág 450-460 en: Kubitzki K. (ed.). The families and genera of vascular plants VI. Flowering plants. Dicotyledons. Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales. Berlin, Heidelberg. New York: Springer.
- Yang, L., Zhang, L., Huang, H., Lin, Z., Liaw, C., Cheng, H., Lee, K., Morris-Natschke, S., Kuo, Y., y Ho, H. (2013). Antioxidant lignans and chromone glycosides from *Eurya japonica*. *Journal of Natural Products*, 76(4): 580-587. Doi: 10.1021/np3007638.
- Ying, W. (2003). Chemical studies on *Adinandra nitida*. (2003). *Journal of China Pharmaceutical University*, 34: 407–409.
- Zhang, R., y Schönerberger, J. (2014). Early floral development of Pentaphylacaceae (Ericales) and its systematic implications. *Plant Systematics and Evolution*, 300: 1547–1560.
- Zivkovic, B., Perrault, G., Sanger, D. (1991). Role of omega receptor subtypes in the action of hypnotic drugs. En: Biological Psychiatry' G Racagni, N BruneUo y T Fukuda, eds. Excerpta Medica. Amsterdam; 1: 856-859.
- Zorumski, C., e Isenberg, K. (1991). Insights into the structure and function of GABA-benzodiazepine receptors: Ion channels and psychiatry. *The American Journal of Psychiatry*, 148: 162-173.
- Zúñiga, M.; y Milocco, N. (2000). *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*. McGraw Hill-Interamericana de España S.A., 1ª ed.
- Zúñiga, J., Tur-Marí, J., Milocco, S., y Piñeiro, R. (2001). *Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal*. Edición McGraw – Hill. Interamericana. España, 205 pp.