

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA
LABORATORIO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA



Actividad antioxidante y efecto ansiolítico de extractos secos estandarizados de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* en ratas Sprague Dawley

PATROCINANTE

Prof. María Eugenia Letelier M.

Laboratorio de Química
Farmacológica y Toxicológica.

Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas.

Universidad de Chile.

DIRECTOR DE TESIS

Prof. María Eugenia Letelier M.

Laboratorio de Química
Farmacológica y Toxicológica.

Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas.

Universidad de Chile.

Memoria de título para optar al título de Bioquímico

Carlos Andrés Gallardo Garrido

SANTIAGO DE CHILE

2015

*“Mejor es adquirir sabiduría que oro preciado;
Y adquirir inteligencia vale más que la plata”*

Proverbios 16:16 RV1960

AGRADECIMIENTOS

Ante todo quiero dar gracias a Dios por nunca dejarme y abrir todas las puertas que me permitieron estar aquí. Gran parte de este logro es mérito de mis padres, los cuales han sacrificado no sólo dinero, sino que también parte de sus vidas al darnos, a mi hermana y a mí, educación, valores y formación como personas. Lo que hoy soy, se lo debo a ellos.

A mi abuelo Eduardo, quien hoy no está junto a nosotros, pero desde lo alto debe estar sonriendo. A mi abuela Laura “La Meme”, por siempre cuidarme y querer lo mejor para mí, y porque lo sigue haciendo con sus otros nietos. A mis abuelos en Talca, por siempre cuidarme y estar preocupados de mí. A mis tíos y tías, por nunca dejar de creer en mí, y nunca dejar de apoyarme en lo que fuera; gran parte de lo que hoy soy, también se lo debo a ellos. A mi hermana Karen, porque a pesar de no entender nada de lo que estudio, siempre me escuchó; gracias por lo que me has dado y el apoyo.

A mis amigos, quienes conocí durante la carrera, Ignacia Benito, Diego Bustos, Belén Cerda, Daniela Inzunza, Mauro Leiva y Carolina Lindsay. Gracias por su apoyo, y por todas las mañanas, tardes y noches que compartimos, no sólo estudiando, sino también estrechando lazos.

Agradecer especialmente a la Prof. María Eugenia Letelier, por creer en mí, aceptarme, y tomarme como su alumno y formarme como profesional. Gracias por la confianza, los consejos y toda la disposición que siempre mostró.

A la Dra. Ximena Polanco, por el apoyo brindado en este trabajo y por abrir las puertas de su laboratorio, por la confianza y por la ayuda brindada. A la Sra. Sdenka Barbery, por el tiempo dedicado a la preparación de los extractos, y también por su paciencia y enseñanza durante mi estadía en el laboratorio.

A los compañeros en el laboratorio, Andrea Müller, Javiera Cortés, Camilo Soto, Nicole Suárez, y tantos otros que ya están en otro lugar; gracias por el apoyo y la preocupación entregadas. A la Prof. Gabriela Díaz por su apoyo en los experimentos conductuales, y a la QF. Carmen Luz Villar por su ayuda en el desarrollo de los experimentos. A don José Riquelme, por todo el apoyo, la ayuda y las conversaciones que tuvimos tomando café.

Índice General

	Página
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE GENERAL	IV
INDICE DE FIGURAS	VI
INDICE DE TABLAS	VII
RESUMEN	VIII
SUMMARY	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	6
Objetivo general	6
Objetivos específicos	6
II. MATERIALES Y MÉTODOS	7
Extractos de <i>Melissa officinalis</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i>	7
Reactivos	7
Animales	7
Actividad antioxidante de los extractos herbales	8
Preparación de microsomas hepáticos de rata	8
Cuantificación de Polifenoles	8
Condiciones oxidativas	9
Lipoperoxidación microsómica	9
Determinación de tioles microsómicos	10
Espectro de absorbancia del Cu ²⁺ en presencia de los extractos de <i>Melissa officinalis</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i>	11

N-desmetilación de aminopirina	11
Evaluación conductual de los animales	12
Actividad motora espontánea	12
Test del laberinto en cruz elevado	13
Análisis Estadístico	14
III. RESULTADOS	15
A. Actividad antioxidante de los extractos herbales	15
Cuantificación de polifenoles	15
Efecto antilipoperoxidativo de los extractos herbales	16
Protección de tioles microsómicos en presencia de <i>Melissa officinalis</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i>	19
Tioles microsómicos en presencia de Cu ²⁺	22
Espectro de absorbancia del Cu ²⁺ en presencia de los extractos de <i>Melissa officinalis</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i>	23
N-desmetilación de aminopirina.	26
B. Evaluación conductual de los animales	27
Parámetros de semiología clínica	27
Actividad motora espontánea	28
Laberinto en cruz elevado	34
Correlación entre la actividad antioxidante y el efecto ansiolítico	37
IV. DISCUSIÓN	39
V. CONCLUSIONES	43
VI. REFERENCIAS	44

Índice de Figuras

N° Figura		Página
1	Lipoperoxidación microsómica en presencia del extracto de <i>Melissa officinalis</i>	17
2	Lipoperoxidación microsómica en presencia del extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i>	18
3	Oxidación de los tioles microsómicos en presencia del extracto de <i>Melissa officinalis</i>	20
4	Oxidación de los tioles microsómicos en presencia del extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i>	21
5	Tioles Microsómicos en presencia de Cu^{2+}	22
6	Espectro de absorbancia de la solución de CuSO_4 0.5mM en presencia del extracto de <i>Melissa officinalis</i>	24
7	Espectro de absorbancia de la solución de CuSO_4 0.5mM en presencia del extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i>	25
8	<i>N</i> -desmetilación de aminopirina en presencia de los extractos de <i>Melissa officinalis</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i>	26
9	Actividad Motora Espontánea total en presencia del extracto de <i>Melissa officinalis</i>	29
10	Actividad Motora Espontánea total en presencia del extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i>	29
11	Tiempo de acicalamiento en presencia del extracto de <i>Melissa officinalis</i>	31
12	Tiempo de acicalamiento en presencia del extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i>	31
13	Levantadas en patas traseras en presencia del extracto de <i>Melissa officinalis</i>	33
14	Levantadas en patas traseras en presencia del extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i>	33
15	Porcentaje de entradas en brazos abiertos en presencia del extracto de <i>Melissa officinalis</i>	35
16	Porcentaje de entradas en brazos abiertos en presencia del extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i>	35

17	Porcentaje tiempo de permanencia en brazos abiertos en presencia del extracto de <i>Melissa officinalis</i>	36
18	Porcentaje tiempo de permanencia en presencia del extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i>	36

Índice de tablas

N° Tabla		Página
1	Concentración de polifenoles de los extractos secos estandarizados de <i>Melissa officinalis</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i>	15
2	Absorbancia máxima de CuSO_4 en presencia de los extractos secos estandarizados de <i>Melissa officinalis</i>	24
3	Absorbancia máxima de CuSO_4 en presencia de los extractos secos estandarizados de <i>Rosmarinus officinalis</i>	25
4	Razón de los resultados obtenidos entre los extractos de <i>Melissa officinalis</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i>	38

**Actividad antioxidante y efecto ansiolítico de extractos secos
estandarizados de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* en ratas
Sprague Dawley**

Las plantas poseen una gran cantidad de compuestos antioxidantes, tales como polifenoles, los cuales han sido aprovechados ampliamente en la medicina popular a través del consumo de estas plantas medicinales para tratar diversas dolencias y enfermedades. Hoy en día, muchas enfermedades se han asociado a estrés oxidativo, frente a lo cual la búsqueda y el desarrollo de nuevas terapias antioxidantes han aumentado considerablemente. Enfermedades neurodegenerativas, tales como Parkinson y Alzheimer, se han asociado a estrés oxidativo, probablemente por altas concentraciones neuronales de cobre y hierro. Así también desordenes psiquiátricos, como depresión y ansiedad, se han asociado a niveles elevados de productos de peroxidación lipídica. De aquí surge nuestro interés en la evaluación de la capacidad antioxidante de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis*, así como el efecto ansiolítico de la administración de preparados herbales de estas plantas en modelo murino.

Se indujo lipoperoxidación de microsomas hepáticos de rata a través del sistema oxidante Cu^{2+} /ascorbato. Ambos extractos previnieron lipoperoxidación, así como fueron capaces de prevenir la disminución de los tioles proteicos inducida por Cu^{2+} , tanto en presencia como en ausencia de ascorbato. Esto indica que los principios activos presentes en estos extractos podrían ejercer su acción antioxidante de, al menos, dos mecanismos: atrapamiento de radicales libres del oxígeno, y quelación de iones metálicos que generan ROS a través de las reacciones de Haber-Weiss y/o Fenton. Más aún, ambos extractos fueron capaces de inhibir la actividad *N*-desmetilante de aminopirina del sistema citocromo P450, el cual metaboliza sustratos lipofílicos. Experimentos conductuales en ratas mostraron que extractos secos estandarizados de ambas plantas produjeron un efecto significativo sobre la actividad motora y exploratoria, lo que indica actividad ansiolítica. Estos resultados preliminares permiten dar paso al desarrollo de nuevos fitofármacos seguros y eficaces para el tratamiento de enfermedades psiquiátricas.

Antioxidant and anxiolytic capacity of standardized dried extracts of *Melissa officinalis* and *Rosmarinus officinalis* in Sprague Dawley rats

Plants have a great amount of antioxidant compounds, such as polyphenols, which have been widely utilized in folk medicine. These medicinal plants have been used to treat various ailments and diseases. Nowadays, many diseases have been associated with oxidative stress, consequently the search and development of new antioxidant therapies have increased considerably. Neurodegenerative diseases such as Parkinson and Alzheimer's diseases have been associated with oxidative stress, probably for high neuronal concentrations of copper and iron. Likewise, psychiatric disorders, including depression and anxiety, have been associated with elevated levels of lipid peroxidation products. Hence, our interest in the evaluation of the antioxidant capacity of *Melissa officinalis* and *Rosmarinus officinalis* and the anxiolytic effect of the administration of these herbal extracts in murine model.

Induced lipid peroxidation of microsomes of rat liver was performed by oxidant Cu^{2+} /ascorbate system. Both extracts prevented lipid peroxidation and were able to prevent depletion of the protein thiols induced by Cu^{2+} in both the presence and absence of ascorbate. This indicates that the active ingredients present in these extracts may exert its antioxidant action at least by two mechanisms: trapping of oxygen free radicals and chelating metal ions that generate ROS through the Haber-Weiss reactions and/or Fenton. Moreover, both extracts were able to inhibit the *N*-demethylating activity of aminopyrine by cytochrome P450, which metabolizes lipophilic substrates. Behavioral experiments on rats showed that dried extracts of both plants produced a significant effect on motor and exploratory activity, indicating anxiolytic activity. These preliminary results allow making way for the development of new safe and effective herbal medicines to treat psychiatric diseases.

I. INTRODUCCIÓN

La depresión y ansiedad son trastornos psiquiátricos que afectan a un gran número de personas en un amplio rango etario. En los últimos años se ha observado un aumento en el consumo de fármacos anti-psicóticos por parte de jóvenes y adultos mayores [1]. Es sabido que el consumo de fármacos psicotrópicos está asociado a una variedad de efectos adversos, tales como efectos anti-colinérgicos (sequedad de boca, visión borrosa, estreñimiento, retención urinaria, agitación, confusión), efectos cardiovasculares (hipotensión ortostática, taquicardia, arritmias) y aumento de peso, con riesgo de padecer obesidad y diabetes [2].

Existen antecedentes que asocian ambos trastornos psiquiátricos a estrés oxidativo [3] mediado por especies reactivas del oxígeno (anión superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno). Así mismo, un gran número de patologías se han asociado a estrés oxidativo, entre las que encontramos las enfermedades cardiovasculares, cáncer, artritis reumatoide, diabetes, y enfermedad de Parkinson [4]. Consecuentemente, pacientes con trastornos depresivos presentan una alta correlación entre altos niveles de malondialdehído (MDA) plasmático y alta actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en eritrocitos, fenómenos que se correlacionan con la severidad del trastorno depresivo [5]. Por otra parte, se ha demostrado que trastornos de ansiedad, incluidos desordenes de pánico y Trastorno Obsesivo-Compulsivo, están asociados a alzas en los productos de peroxidación lipídica, específicamente MDA [6]. Asimismo, en pacientes con trastornos depresivos severos se ven incrementados los niveles plasmáticos de Glutación reductasa (GR) y MDA, así como los niveles de Glutación peroxidasa (GSH-Px), SOD y MDA en eritrocitos, en comparación a los sujetos sanos [7].

Sumado a lo anteriormente descrito, se ha visto que en enfermedades neurodegenerativas existe un aumento de la concentración de metales de transición [8], los cuales se encuentran en estado iónico como Cu^{+2} y Fe^{+3} . Sin embargo, las propiedades biológicas y químicas de estos metales también pueden pasar a ser tóxicas [9]. Estos dos iones Cu^{+2} y Fe^{+3} en su estado

reducido, Cu^+ y Fe^{+2} , son capaces de generar radicales libres a través de las reacciones de Haber-Weiss [10] y/o Fenton [11].

Estos antecedentes han provocado que en la actualidad se encuentren en desarrollo estrategias terapéuticas antioxidantes contra enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas [3, 12]. Las plantas medicinales, especialmente sus hojas poseen un alto contenido de antioxidantes, especialmente, polifenoles. Es por ello que durante los últimos años ha aumentado la búsqueda de nuevas terapias para enfermedades psiquiátricas a partir de plantas medicinales [13]. Al respecto, preparados de hojas de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* han mostrado tener actividad antioxidante, así como actividad psicotrópica [14, 15].

Melissa officinalis, es una planta de la familia Lamiaceae conocida como melisa y/o toronjil. Se caracteriza por tener una altura cercana a un metro, con un tallo cuadrangular muy ramificado y ligeramente piloso. Además, posee hojas pecioladas, opuestas, amarillo-verdosas, dentadas y con olor a limón. Es originaria de Europa, ampliamente distribuida en zonas de clima mediterráneo, en el oeste de Asia y en el norte de África. La droga vegetal está constituida por las hojas de esta planta. Dentro de su composición química se encuentran aldehídos monoterpénicos, como citronelal; monoterpenos, como geraniol; flavonoides, como apigenina y quercitósido; y también otros compuestos como ácidos fenilcarboxílicos como ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido rosmarínico y ácido succínico [16].

Las hojas de esta planta han sido utilizadas en la medicina popular por sus propiedades sedativas, espasmolíticas y anti-bacterianas. Por otra parte, se ha observado que extractos acuosos de *Melissa officinalis* presentan propiedades anti-inflamatorias [14]. Asimismo, extractos alcohólicos de hojas de esta planta han mostrado efectos tipo-antidepresivos y ansiolíticos, comparables a diazepam en ratas [17]. Los autores sugieren que algunos de los componentes de los extractos de *Melissa officinalis* ejercerían un efecto inhibitorio sobre la actividad de la transaminasa del ácido γ -aminobutírico (GABA-T), incrementando

la concentración cerebral del ácido γ -aminobutírico (GABA) y con ello el efecto inhibitorio sobre la excitabilidad neuronal.

Rosmarinus officinalis es un arbusto aromático perenne de la familia Lamiaceae, conocido popularmente como Romero. Es originaria de la zona costera rocosa del mediterráneo y de África. Este arbusto posee una altura cercana a un metro, y sus hojas son simples, opuestas, sésiles, lineares y coriáceas. La droga vegetal está constituida por las hojas, y en menor medida por las flores. Su composición química es variada e incluye en sus aceites esenciales hidrocarburos monoterpénicos como α -pineno y limoneno, terpenoides, como carnosol; flavonoides, como apigenina y luteolina; y otros compuestos como ácidos hidroxicinámicos como ácido cafeico, clorogénico y rosmarínico, y también posee colina y taninos [16, 18]. Esta planta es bien conocida por sus aplicaciones culinarias. Tradicionalmente se han utilizado sus hojas como espasmolítico, hepatoprotector y anti-inflamatorio. Se han descrito efectos anti-nociceptivos probados en roedores [15].

Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que ratas tratadas con un extracto hidroalcohólico estandarizado de *Rosmarinus officinalis* presentaban efectos antidepresivos y ansiolíticos comparables a fluoxetina y a diazepam [19]. Esto indicaría, que los componentes de *Rosmarinus officinalis* actuarían sobre GABA-T aumentando el efecto inhibitorio de GABA, sumado a un posible efecto inhibitorio sobre la recaptación presináptica de serotonina [20].

Respecto de los compuestos responsables de la acción psicotrópica presentes en los extractos polivalentes de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis*, no existen antecedentes. Cabe señalar que los mediadores neurológicos de las actividades psicotrópicas son en general aminos. Resultados de nuestro laboratorio mostraron que un extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* era capaz de inhibir la *N*-desmetilación de aminopirina, reacción catalizada por el sistema oxidativo citocromo P450 [21, 22]. Este sistema enzimático es el principal responsable de la biotransformación de xenobióticos lipofílicos, característica fisicoquímica indispensable para todos los principios activos responsables de la actividad psicotrópica y antioxidante a nivel neuronal; ellos

deben atravesar la barrera hemato-encefálica, fenómeno que es dependiente de la lipofilidad de dichos compuestos.

Los antecedentes presentados muestran que preparados de las hojas de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* presentan algunas acciones terapéuticas a nivel de sistema nervioso central, como son las actividades sedante, ansiolítica y antidepresiva. Asimismo, extractos de las hojas de ambas plantas presentan actividad antioxidante, la cual podría deberse a la presencia de compuestos polifenólicos.

Los estudios farmacológicos relacionados con los efectos psicotrópicos de preparados de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* son escasos. Más aún, existe una diversidad de preparados comerciales de hojas de estas plantas los cuales no poseen estudios toxicológicos y tampoco se conoce en base a qué se determina la posología de los mismos. Cabe señalar que pacientes que sufren desórdenes afectivos presentan niveles alterados de lipoperoxidación y de la actividad de algunas enzimas antioxidantes [6]. Es por ello que en este trabajo se estudió la capacidad antioxidante y ansiolítica de los extractos secos estandarizados de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis*. Los experimentos realizados se orientaron a la prevención de procesos redox sobre biomoléculas lipofílicas y/o localizadas en membranas biológicas, y también al efecto farmacológico ansiolítico de estos extractos secos sobre modelo murino. Así, como sistema biológico, se utilizó una preparación experimental de retículo endoplásmico hepático de rata (microsomas) y como sistema pro-oxidante, Cu^{2+} /ascorbato; y para el efecto farmacológico se utilizaron ratas macho Sprague Dawley.

Los ensayos bioquímicos realizados fueron: 1) prevención de la lipoperoxidación microsómica y de la disminución de los tioles microsómicos, ambos fenómenos inducidos por Cu^{2+} /ascorbato; 2) la capacidad de estos extractos de quelar iones Cu^{2+} mediante la alteración del espectro de absorbancia de una solución de CuSO_4 ; 3) la capacidad de inhibir la *N*-desmetilación de aminopirina, reacción catalizada por el sistema oxidativo citocromo P450, el cual cataliza la biotransformación de xenobióticos lipofílicos [22]; y los experimentos

conductuales realizados fueron: 1) Medición de la actividad motora espontánea, lo que incluye la cuantificación de la actividad motora total, tiempo de acicalamiento y número de levantadas sobre las patas traseras; 2) Test de laberinto en cruz elevado.

Ambos extractos mostraron actividad anti-lipoperoxidante, la cual fue concentración-respuesta. De la misma forma, ambos extractos inhibieron la oxidación de los tioles microsómicos. Por otra parte, ellos alteraron el espectro de absorbancia del Cu^{2+} e inhibieron la actividad *N*-desmetilante de aminopirina. Además, ambos extractos mostraron una disminución en la actividad motora espontánea, y un aumento en el porcentaje de entradas y tiempo de permanencia a los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado. Estos resultados, aunque preliminares, son promisorios para el desarrollo de nuevos fitofármacos que puedan ser utilizados para el tratamiento de trastornos psiquiátricos, para así mejorar la calidad de vida de los pacientes de todo rango etario.

HIPÓTESIS

Los extractos secos estandarizados provenientes de hojas de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis*: 1) presentan propiedades antioxidantes sobre componentes de membranas biológicas, 2) son capaces de inhibir significativamente la actividad enzimática del sistema oxidativo del citocromo P450, 3) presentan un efecto ansiolítico en ratas Sprague Dawley.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos secos de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis*, y su relación con la capacidad ansiolítica de estos extractos en ratas Sprague Dawley.

Objetivos específicos

1. Determinar el contenido total de polifenoles de los extractos de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis*.
2. Evaluar comparativamente la capacidad de los extractos de prevenir la oxidación de los lípidos y tioles de microsomas hepáticos de rata la cual será inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato.
3. Evaluar la capacidad de los extractos de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* de interactuar con Cu^{2+} .
4. Determinar la actividad *N*-desmetilante de aminopirina del sistema oxidativo citocromo P450 en microsomas hepáticos de rata en presencia de los extractos.
5. Evaluar el efecto de los extractos sobre la conducta de ratas Sprague Dawley en modelos de ansiedad.
6. Comparar el efecto ansiolítico de los extractos con diazepam.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Extractos de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis*

Los extractos secos de hojas (droga vegetal) de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* fueron provistos por Laboratorios Ximena Polanco (Santiago, Chile). Ellos fueron obtenidos por extracción hidroalcohólica de hojas de estas plantas y luego llevados a sequedad. Los procedimientos detallados de la obtención de estos extractos son propiedad de la empresa.

Reactivos

Catequina ((2*R*,3*S*)-2-(3,4-dihroxifenil)-3,4-dihidro-2*H*-cromeno-3,5,7-triol) y Ascorbato de sodio, se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), la albúmina sérica de bovino (Fracción IV) fueron obtenidos en Sigma Chemical Co (EE.UU.). El ácido tricloroacético (TCA), el ácido tiobarbitúrico (TBA), el CuSO₄ y el reactivo de Folin-Ciocalteu fueron adquiridos en Merck (Chile). El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

El fármaco de referencia (control positivo) para actividad ansiolítica fue diazepam, el cual fue obtenido de F. Hoffmann-La Roche, Basel, Suiza.

Animales

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague Dawley, de tres meses de edad y de un peso corporal aproximado de 250g. Los animales se mantuvieron 8 por caja con una dieta normal de pellet y agua *ad libitum*, ciclos de luz y oscuridad de 12/12 horas, y a una temperatura ambiental de 21±1°C. Estos animales se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Los protocolos de experimentación en animales fueron aprobados por el Comité de Ética de la misma Facultad. Asimismo, todos los experimentos de conducta animal fueron llevados a cabo de acuerdo a los estándares internacionales de bienestar animal, recomendados por la Sociedad de Neurociencia [23]. El número de animales, como el tiempo de tratamiento considerado, correspondió a los mínimos requeridos para obtener datos estadísticamente significativos. Cada animal fue tratado y analizado una sola vez.

A. Actividad antioxidante de los extractos herbales

Preparación de microsomas hepáticos de rata

Esta fracción subcelular fue preparada de acuerdo a Letelier y cols., 2010 [24]. Las ratas fueron sometidas a ayuno por 15h con agua *ad libitum* y sacrificadas por decapitación. Los hígados fueron perfundidos *in situ* con NaCl 0.9%p/V, removidos por incisión, y puestos en hielo. El tejido hepático carente del tejido conectivo y vascular, fue homogenizado con 4 volúmenes de 0.154M de KCl, con ocho pasajes en un homogeneizador Dounce Wheaton B utilizando un motor Heidolph modelo RZR1 a 250rpm. El homogeneizado fue centrifugado a 9,000g por 15min en una centrífuga con refrigeración Hermle modelo Z326K; el sedimento fue descartado y el sobrenadante fue centrifugado 60min a 105,000g en una ultracentrífuga Beckman modelo XL-90. El pellet (microsomas) fue almacenado a -80°C en un Freezer-II Shin modelo DF8514 hasta su uso. La cuantificación de la proteína microsómica se determinó por el método de Lowry y cols., 1951 [25], utilizando albúmina sérica de bovino (fracción IV) como estándar.

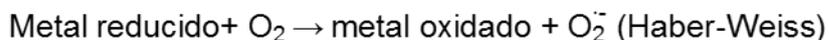
Cuantificación de Polifenoles

La determinación de polifenoles totales de los extractos herbales se realizó de acuerdo al método descrito en Letelier y cols., 2008 [26].

En un volumen final de 2mL la mezcla de reacción contenía: diferentes concentraciones de los extractos herbales, 100µL de reactivo Folin Ciocalteau, 300µL de carbonato de sodio 20%p/V y agua destilada suficiente para completar 2mL. El blanco contenía todos los reactivos con excepción de los extractos herbales. Todas las mezclas así obtenidas fueron incubadas a oscuridad durante 2h. Al finalizar este periodo, la absorbancia de las muestras fue registrada a 760nm en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV/VIS, usando los blancos respectivos como referencia. La linealidad del método se analizó realizando una curva de calibración utilizando catequina como estándar.

Condiciones oxidativas

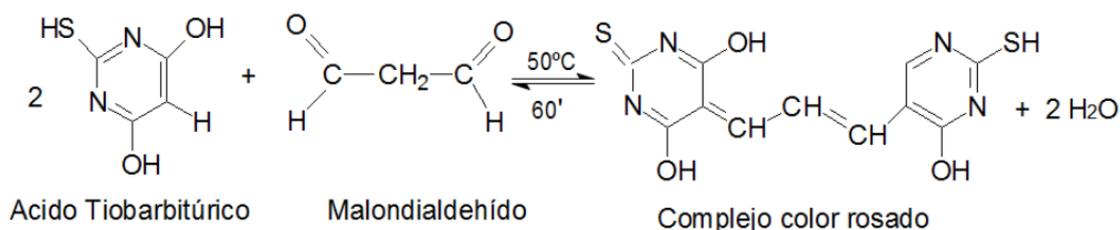
Se utilizó CuSO_4 25nM y ascorbato 1mM; este sistema genera anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a través de las reacciones Haber-Weiss [10] y/o Fenton [11].



Liperoxidación microsómica

La liperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato se estimó determinando las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo al método descrito por Letelier y cols., 2005 [9]. El malondialdehído, generado como producto de la descomposición de los lipoperóxidos formados, reacciona con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a un conjugado, el cual posee una absorbancia máxima a 532nm ($\xi_{532} = 156,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

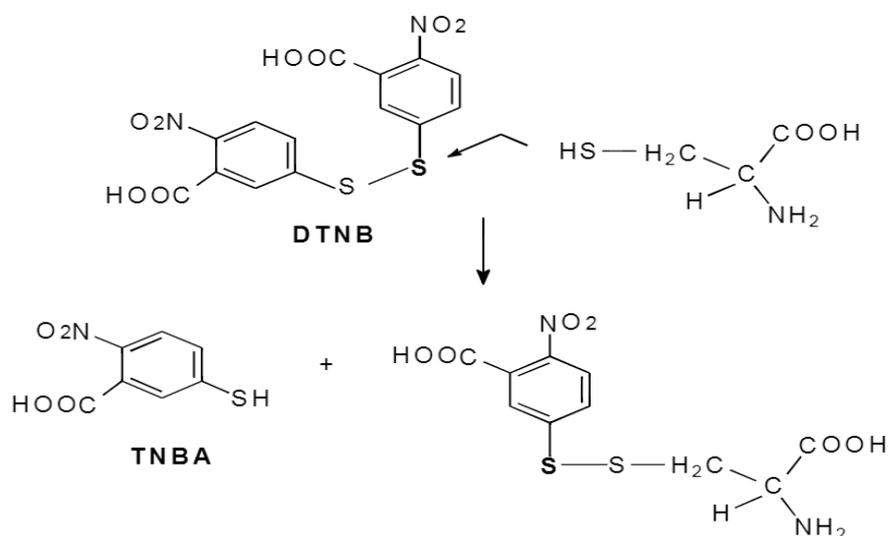
Las mezclas de reacción contenían en concentraciones finales: microsomas (0.5mg de proteína) suspendidos en amortiguador fosfato 50mM, pH 7.4 las cuales fueron preincubadas con los extractos durante 5min a 37°C antes de agregar el sistema oxidante Cu^{2+} /ascorbato. Los blancos contenían todos los reactivos con la única excepción de la proteína microsómica. Muestras y blancos fueron incubados en una bañõ termorregulado Julabo SW-21C, durante 20min a 37°C con agitación constante. Al cabo de este período, se les adiciono 0.25mL de TCA 20%p/V frío (4°C). Luego, fueron centrifugados a 9,000g durante 10min a 4°C en una centrífuga Hermle, modelo Z326K. Alícuotas de 0.5mL de los sobrenadantes de las muestras y los blancos fueron mezcladas con 0.5mL de TBA 35mM y luego, incubadas durante 60min a 50°C para el desarrollo de color. Al término de este periodo, se registró la absorbancia de las muestras a 532nm en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV/VIS, usando los blancos como referencia. Los resultados fueron expresados en porcentaje de liperoxidación residual.



Determinación de tioles microsómicos

La medición de los tioles microsómicos se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Letelier y cols., 2005 [9]. Esta técnica cuantifica espectrofotométricamente el TNB liberado en la reacción entre DTNB y los grupos sulfhidrilos presentes en la muestra. Este compuesto absorbe a 412nm y su coeficiente de extinción es $13,600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La mezcla de reacción contenía los reactivos siguientes (concentraciones finales) en un volumen final de 1.5mL: amortiguador fosfato de potasio 50mM, pH 7.4; proteína microsómica 0.5mg/mL y DTNB 0.3mM. A continuación las mezclas fueron preincubadas con los extractos durante 5min a 37°C antes de agregar el sistema oxidante Cu^{2+} /ascorbato y amortiguador fosfato 50mM, pH 7.4. Los blancos contenían todos los reactivos con la única excepción de la proteína microsómica. Muestras y blancos fueron incubados en una bañó termostático Julabo SW-21C, durante 20min a 37°C con agitación constante. Posteriormente, se agregó DTNB 0.3mM. Luego se incubó 1h a 37°C con agitación constante. A continuación las muestras se centrifugaron a 15,000g durante 10min en una centrífuga refrigerada (4°C) Hermle modelo Z326K, con el objeto de decantar la suspensión microsómica. A continuación, las absorbancias de los sobrenadantes se leyeron a 412nm en un espectrofotómetro Unicam UV/VIS modelo UV3 acoplado a un computador, utilizando para ello sus blancos respectivos. Los resultados fueron expresados en porcentaje de tioles microsómicos oxidados residuales.



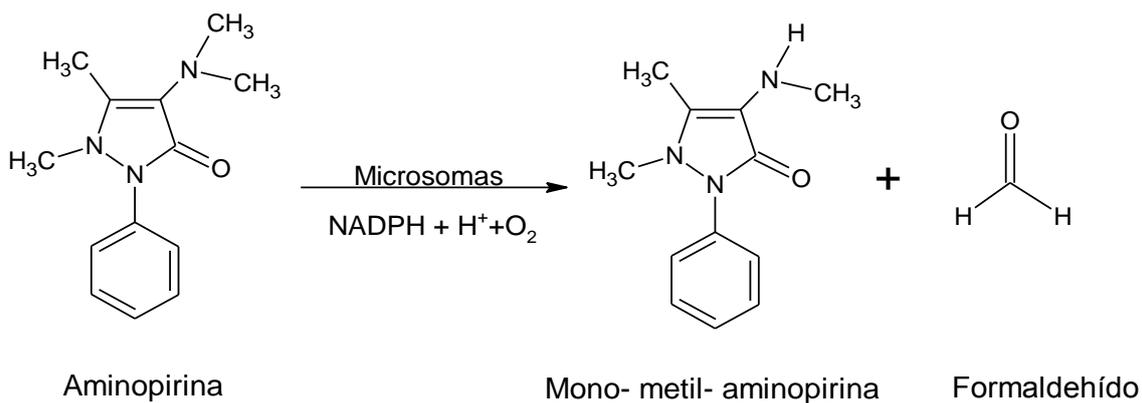
Espectro de absorbancia del Cu²⁺ en presencia de los extractos de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis*

La medición de la interacción entre cobre y los extractos se determinó realizando un barrido de una solución de CuSO₄ 0.5mM entre 200 y 600nm en ausencia y presencia de los extractos en estudio. Para realizar el barrido de la solución de CuSO₄ 0.5mM se utilizó buffer fosfato 50mM, pH 7.4 como blanco. Asimismo, el blanco correspondiente a las mezclas cobre – extracto contenía todos los reactivos a excepción del cobre. Las concentraciones de ambos extractos ensayadas fueron: 300 y 500µg/mL de mezcla. Estos ensayos se realizaron en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV/VIS conectado a un computador.

N-desmetilación de aminopirina

La actividad N-desmetilante del sistema oxidativo del citocromo P450 se determinó por el método colorimétrico de Letelier et al., 2009 [27].

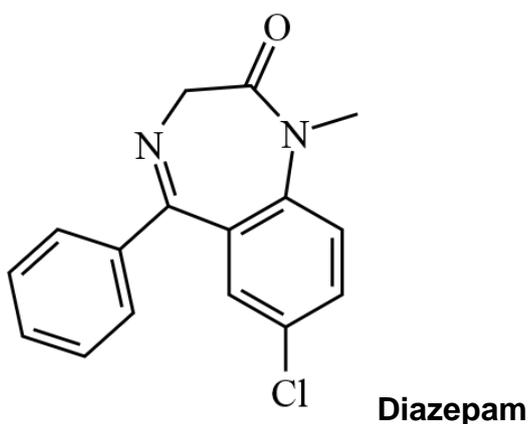
La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen de 1mL: amortiguador TRIS 50mM pH 8.5; MgCl₂ 4.0mM; proteína microsómica 2mg, aminopirina 2mM; sistema generador de NADPH constituido por glucosa-6-fosfato 6mM, NADP 0.6mM y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 5.0U. El blanco contenía todos los reactivos excepto la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La reacción enzimática se inició agregando la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La mezcla se incubó durante 15min a 37°C en un baño termostático, con agitación constante. La reacción se detuvo precipitando las proteínas con 500µL de TCA 10%p/V frío (4°C). Luego, las mezclas se centrifugaron a 9,000g durante 10min en una centrífuga refrigerada (4°C) Heraeus Biofuge 15R, con el objeto de separar las proteínas. Alícuotas de 1mL de los sobrenadantes se mezclaron con 0.5mL de una mezcla constituida por 0.1mL de 2,4-pentanediona y 25mL acetato de amonio 4M. Luego se mantuvieron en oscuridad durante 2h a temperatura ambiente. Al término de este período, se leyó la absorbancia de las muestras a 400nm contra sus blancos en un espectrofotómetro UNICAM VIS modelo 3, acoplado a un computador. El producto de la reacción se cuantificó usando como estándar formaldehído, producto de la reacción enzimática. La actividad enzimática se expresó en nmoles de HCHO formado/min/mg de proteína microsómica.



Evaluación conductual de los animales

Los animales se dividieron en jaulas conteniendo 8 machos por grupo de tratamiento.

Los extractos secos de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* fueron disueltos en agua destilada al momento de usarlos, así como diazepam. Los preparados de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* como también el diazepam (control positivo) y solución salina (control negativo) fueron inyectados vía intraperitoneal (i.p.) a los animales. Las dosis de los extractos administradas a las ratas fue determinada según estudios preliminares y fluctuó entre los 6.25mg/kg y los 50mg/kg mientras que el diazepam fue administrado en una dosis única de 1mg/kg. En todos los casos el volumen administrado a cada rata fue de 1mL/kg [28].



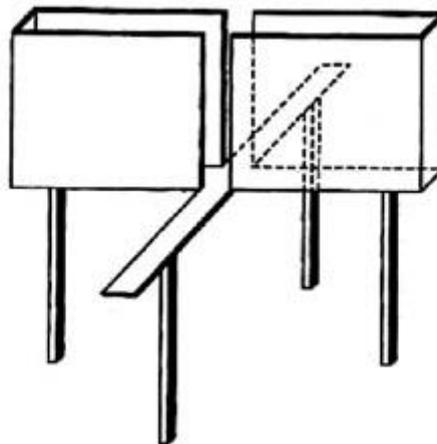
Como se observa en la estructura del diazepam, este compuesto a pesar de poseer un grupo carbonilo y aminas, la resonancia electrónica propia de este no le permitiría actuar como antioxidante.

Actividad motora espontánea

Treinta minutos posteriores al tratamiento con los extractos, las ratas tratadas y las controles fueron dispuestas individualmente en una caja de Plexiglass (30x30x30cm) situada en una cámara a prueba de sonido. El piso de esta caja corresponde a una plataforma de actividad que posee un contador electromecánico conectado a un amplificador (Lafayette Instruments Co, USA). La actividad motora total fue monitoreada cada 5min durante un periodo de 30min. Simultáneamente, se registró el número de veces que el animal se levantaba, y el tiempo que utilizaba en acicalarse. Cada animal fue observado continuamente de forma directa a través de una cámara de video conectada a un computador de escritorio, donde fue grabada cada medición. Los videos fueron utilizados para re-análisis posteriores cuando fue necesario.

Test del laberinto en cruz elevado

Este test ha sido ampliamente validado como medida de la ansiedad en roedores [29]. El aparato consiste en dos brazos abiertos (50x10cm cada uno), y dos cerrados (50x10x20cm cada uno) y una plataforma central (10x10cm), dispuesto de manera tal que los dos brazos de cada tipo estén opuestos uno del otro. El laberinto está elevado 100cm del suelo. El piso del laberinto está construido de madera laminada. Cada animal fue situado en el centro del laberinto mirando hacia alguno de los brazos cerrados 6min después de la medición de la actividad motora espontánea.



El número de entradas a los brazos abiertos y cerrados, además del tiempo que se mantuvo dentro de cada uno de ellos se registró durante los 5min del test [30]. La entrada en cada brazo está definida como el punto en el cual el animal coloca las cuatro patas dentro de un brazo. Después de realizado el test, el laberinto fue limpiado cuidadosamente con un papel húmedo con alcohol al 10%.

Análisis Estadístico

La significancia estadística de los resultados de la capacidad antioxidante de los extractos herbales fue analizada mediante el t-Student y análisis de regresión. Los datos de evaluación conductual fueron analizados por ANOVA de una vía de varianza seguido por un test multicomparativo de Newman-Keuls. En ambos casos se utilizó el software GraphPad Prism 5.0. Las diferencias se consideraron como significativas, cuando $p < 0.05$.

III. RESULTADOS

A. Capacidad antioxidante de los extractos herbales

Cuantificación de polifenoles

Como una forma de relacionar la capacidad antioxidante de los extractos con la presencia de los agentes antioxidantes mayoritarios en las hojas de las plantas medicinales, se determinó la concentración de polifenoles de ambos extractos. El extracto seco de *Melissa officinalis* contenía aproximadamente 4 veces menor cantidad de polifenoles que el extracto de *Rosmarinus officinalis*: $25.5 \pm 0.69 \mu\text{g}$ vs $110.1 \pm 24.79 \mu\text{g}$ equivalentes de catequina/mg de extracto, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de Polifenoles totales de los extractos

Extractos secos	Concentración de Polifenoles (μg equivalentes de catequina/mg de extracto seco)
<i>Melissa officinalis</i> Serie N° 069262.	25.5 ± 0.69
<i>Rosmarinus officinalis</i> Serie N°049022.	110.1 ± 24.79

La determinación de polifenoles se encuentra descrita en Métodos. Todos los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes \pm D.E

Efecto antilipoperoxidativo de los extractos herbales

Los extractos de *Melissa officinalis* y de *Rosmarinus officinalis* inhibieron la lipoperoxidación microsómica de una forma concentración – respuesta. Los valores de EC₅₀ obtenidos de las curvas semilogarítmicas construida con los datos de porcentaje de lipoperoxidación residual *versus* el logaritmo de las concentraciones de extracto fueron 24.9µg para *Melissa officinalis* y 3.9µg para *Rosmarinus officinalis* (Figura 1 y 2).

Estos datos indican que el extracto de *Rosmarinus officinalis* es aproximadamente 6 veces mejor antilipoperoxidante que el extracto de *Melissa officinalis*, ya que se necesitaron 6 veces menor cantidad de *Rosmarinus officinalis* para inhibir en un 50% la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu²⁺/ascorbato en las condiciones de ensayo descritas (Figura 1 y 2).

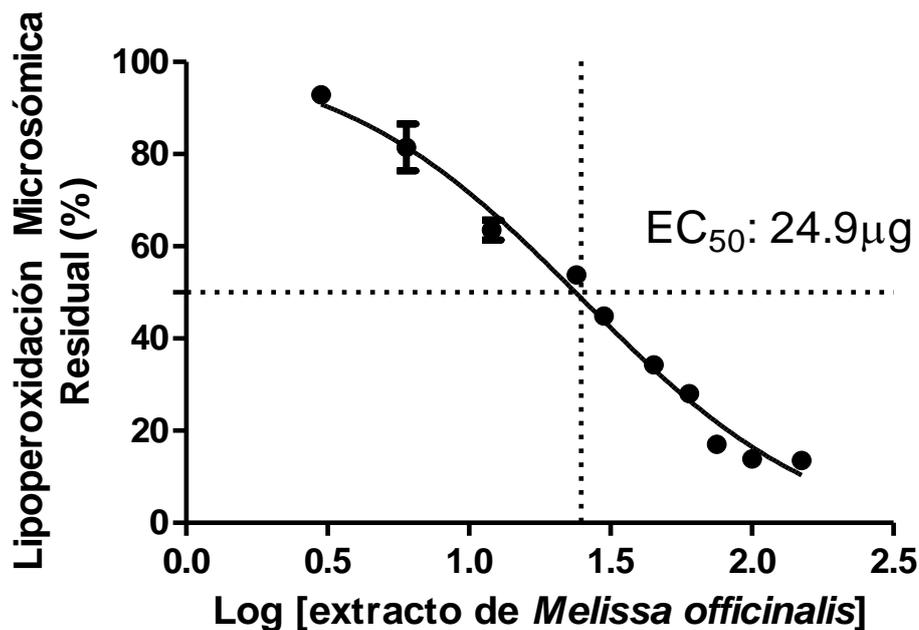


Figura 1. Lipoperoxidación microsómica en presencia del extracto de *Melissa officinalis*. Curva semilogarítmica del efecto inhibitorio de *Melissa officinalis* sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato. Microsomas (0.5mg/mL) fueron incubados durante 5 min con las distintas concentraciones del extracto de *Melissa officinalis* (3.0 - 150 μ g) antes de adicionar el sistema Cu^{2+} /ascorbato para inducir la lipoperoxidación microsómica de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los porcentajes de inhibición fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación medida en presencia del sistema Cu^{2+} /ascorbato y en ausencia de los extractos herbales. Los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes \pm E.E.

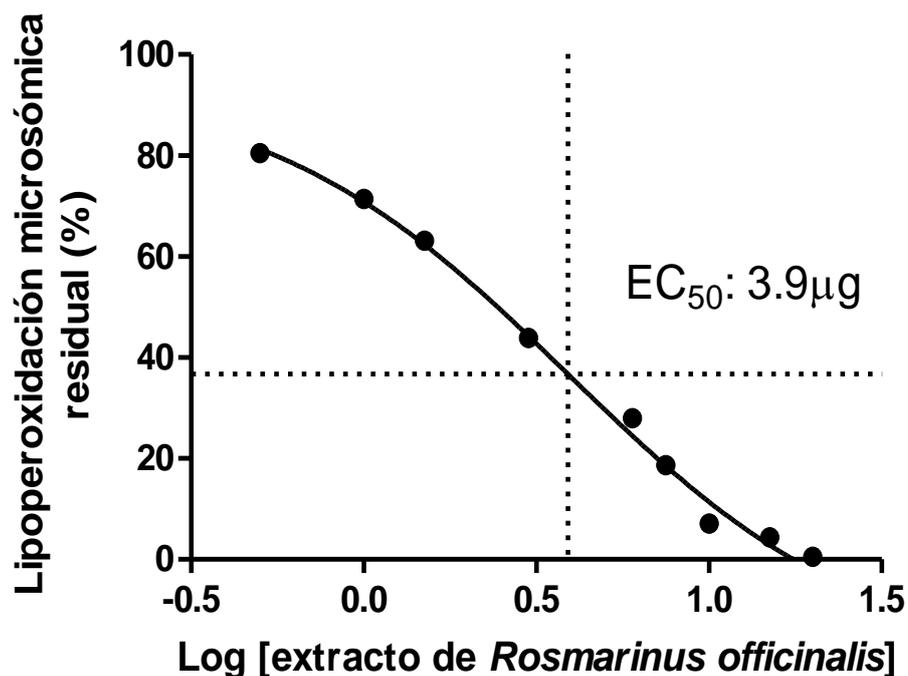


Figura 2. Lipoperoxidación microsómica en presencia del extracto de *Rosmarinus officinalis*. Curva semilogarítmica del efecto inhibitorio de *Rosmarinus officinalis* sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu²⁺/ascorbato. Microsomas (0.5mg/mL) fueron incubados durante 5 min con las distintas concentraciones del extracto de *Rosmarinus officinalis* (0.5 - 20µg) antes de adicionar el sistema Cu²⁺/ascorbato para inducir la lipoperoxidación microsómica de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los porcentajes de inhibición fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación medida en presencia del sistema Cu²⁺/ascorbato y en ausencia de los extractos herbales. Los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes ± E.E.

Protección de tioles microsómicos en presencia de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis*

La preincubación de los microsomas con los extracto herbales por 5min antes de adicionar el sistema pro-oxidante Cu^{2+} /ascorbato, inhibió la pérdida de los tioles microsómicos de una forma concentración - respuesta (Figura 3 y 4). Los valores de los EC_{50} calculados de los gráficos semilogarítmicos fueron $26.9\mu\text{g}$ y $9.56\mu\text{g}$ para los extractos de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis*, respectivamente (Figura 3 y 4). Estos valores demuestran que la capacidad del extracto de *Rosmarinus officinalis* de prevenir la oxidación de los tioles microsómicos es aproximadamente 3 veces mayor que la del extracto de *Melissa officinalis*.

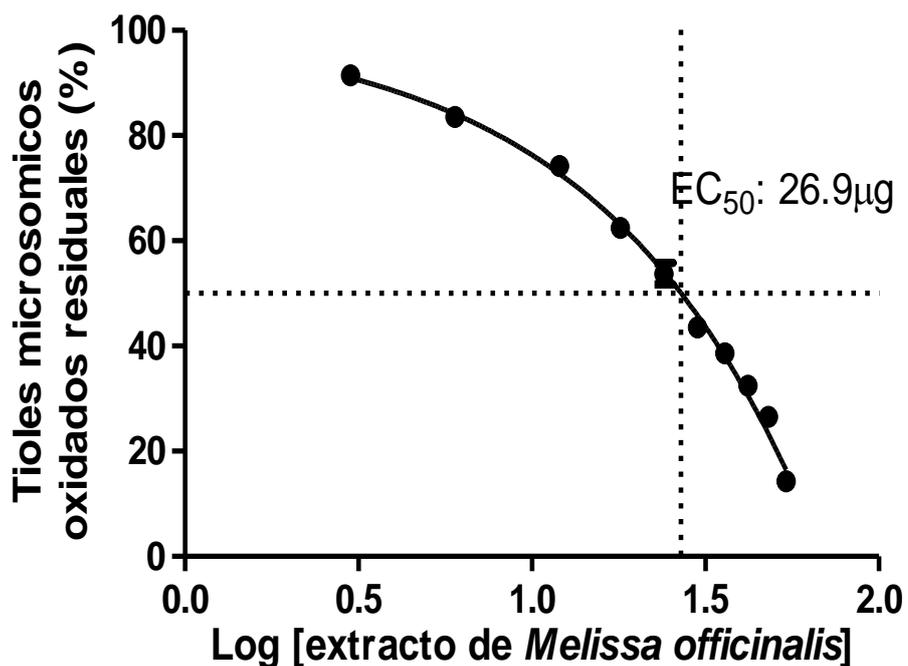


Figura 3. Oxidación de los tioles microsómicos en presencia del extracto de *Melissa officinalis*. Curva semilogarítmica del efecto del extracto de *Melissa officinalis* sobre la oxidación de los tioles microsómicos inducido por el sistema Cu^{2+} /ascorbato. Los microsomas (0.5mg/mL) fueron preincubados durante 5 min con las distintas concentraciones de *Melissa officinalis* (3 - 54 μg) antes de adicionar el sistema Cu^{2+} /ascorbato. Los porcentajes de tioles oxidados se obtuvieron considerando como 100% los tioles determinados en presencia del sistema Cu^{2+} /ascorbato y en ausencia de los extractos herbales. La determinación se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Todos los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes \pm E.E.

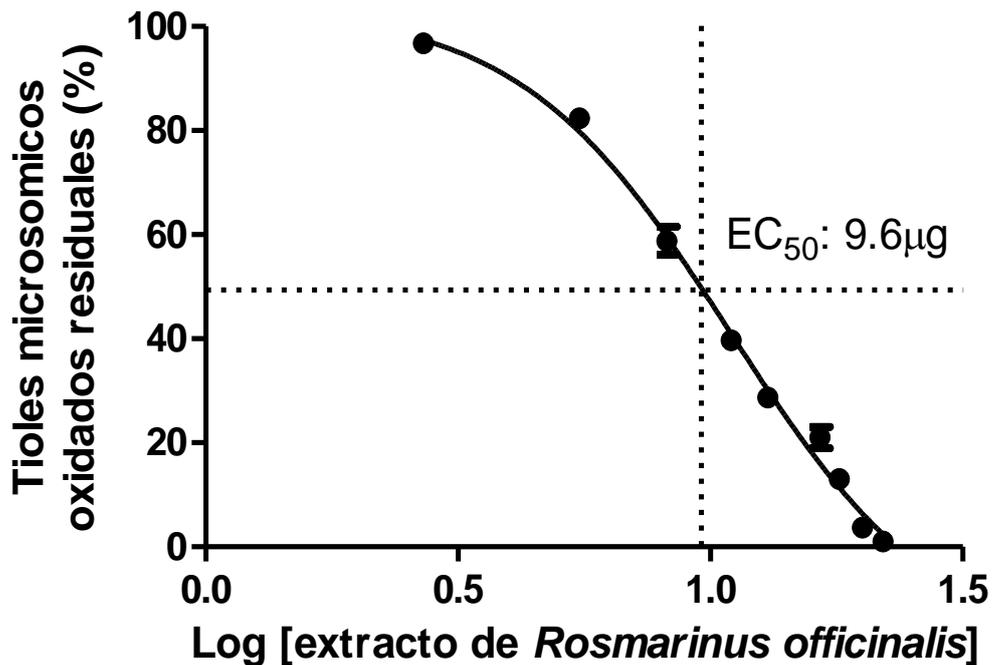


Figura 4. Oxidación de los tioles microsómicos en presencia del extracto de *Rosmarinus officinalis*. Curva semilogarítmica del efecto del extracto de *Rosmarinus officinalis* sobre la oxidación de los tioles microsómicos inducido por el sistema Cu^{2+} /ascorbato. Los microsomas (0.5mg/mL) fueron preincubados durante 5 min con las distintas concentraciones de *Rosmarinus officinalis* (2.7 - 22µg) antes de adicionar el sistema Cu^{2+} /ascorbato. Los porcentajes de tioles oxidados se obtuvieron considerando como 100% los tioles determinados en presencia del sistema Cu^{2+} /ascorbato y en ausencia de los extractos herbales. La determinación se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Todos los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes \pm E.E.

Tioles microsómicos en presencia de Cu^{2+}

Dado que la membrana microsómica contiene proteínas tiólicas (GSH-transferasa, monooxigenasa del citocromo P450, UDP-glucuroniltransferasa, etc.), la presencia de iones cobre en concentración μM podría afectar a estas proteínas por la capacidad del azufre tiólico de quelar estos iones. Es por ello que se incubaron microsomas con CuSO_4 $50\mu\text{M}$ durante 30min a 37°C y luego 60 min con DTNB 0.3mM para cuantificar los grupos tiólicos presentes en esta membrana.

Como se esperaba, los iones cobre provocaron una disminución del contenido total de tioles de aproximadamente un 80%. Ambos extractos previnieron parcialmente esta disminución, siendo el extracto de *Rosmarinus officinalis* el que produjo el mayor efecto. Así, la concentración máxima ensayada de los extractos de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* ($100\mu\text{g}$ de extracto/ $250\mu\text{g}$ de proteína microsómica) provocó aumentos de 15% y 30% de los tioles microsómicos residuales, respectivamente (Figura 5).

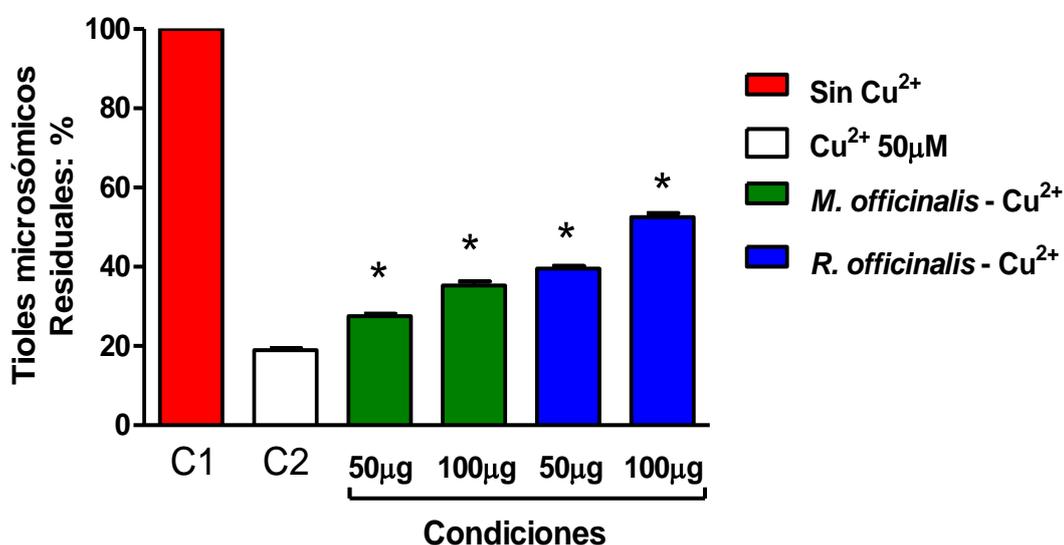


Figura 5. Tioles Microsómicos en presencia de Cu^{2+} . Microsomas hepáticos de rata (0.25mg de proteína microsómica); CuSO_4 $50\mu\text{M}$. C1: microsomas incubados en ausencia de Cu^{2+} y extractos; C2: microsomas incubados solo con Cu^{2+} . Las condiciones del ensayo están descritas en Métodos. Todos los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes \pm E.E. (*) Valores significativamente diferentes a Cu^{2+} $50\mu\text{M}$, $p < 0.05$.

Espectro de absorbancia del Cu²⁺ en presencia de los extractos de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis*

Ambos extractos disminuyeron la absorbancia característica a 241nm de la solución de CuSO₄. El extracto de *Melissa officinalis* (300 y 500µg) presentó un nuevo pico a 370nm (Figura 6). Más aún, la absorbancia máxima a esta longitud de onda parece depender de la concentración de *Melissa officinalis* adicionada a la solución de CuSO₄; la relación entre las concentraciones de extracto ensayadas (500µg/300µg=1.67) fue similar a la relación de las absorbancias máximas a 370 nm determinada en ambas condiciones de concentración del extracto de *Melissa officinalis* (0.215/0.138 = 1.56) (Tabla 2).

En iguales condiciones, el extracto de *Rosmarinus officinalis* (300µg y 500µg) presentó nuevos picos de absorbancia a 292nm, 384nm y 434nm (Figura 7). El máximo de absorbancia del pico a 241nm característico del ion cúprico como también el del pico de absorbancia obtenido a 384nm parece depender de la concentración de *Rosmarinus officinalis* adicionada a la solución de CuSO₄. Así, la relación entre las concentraciones 500µg y 300µg del extracto de *Rosmarinus officinalis* ensayadas (500µg/300µg=1.67) fue similar a la relación de las absorbancias máximas determinadas a 241nm y 384nm obtenidas en ambas condiciones de concentración del extracto; estas relaciones fueron 0.849/0.496=1.71 y 0.351/0.201=1.74, respectivamente (Tabla 2 y 3).

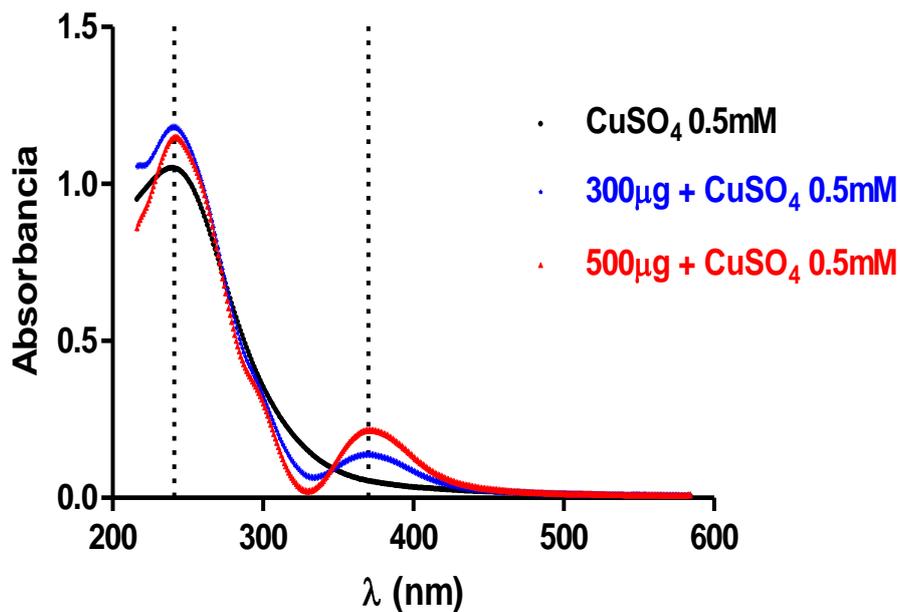


Figura 6. Espectro experimental de absorbancia de la solución de **CuSO₄ 0.5mM** en presencia del extracto *Melissa officinalis*. Las condiciones del ensayo están descritas en Métodos.

Tabla 2. Picos de absorbancia máxima de CuSO₄ en presencia De *Melissa officinalis*.

Longitud de onda	241nm	370nm
CuSO ₄ 0.5mM	1.116 ± 0.065	-----
<i>Melissa officinalis</i> 300µg +CuSO ₄	1.181 ± 0.008	0.138 ± 0.006
<i>Melissa officinalis</i> 500µg +CuSO ₄	1.148 ± 0.003	0.215 ± 0.005

Los valores representan el promedio de al menos cuatro determinaciones independientes ± D.E.

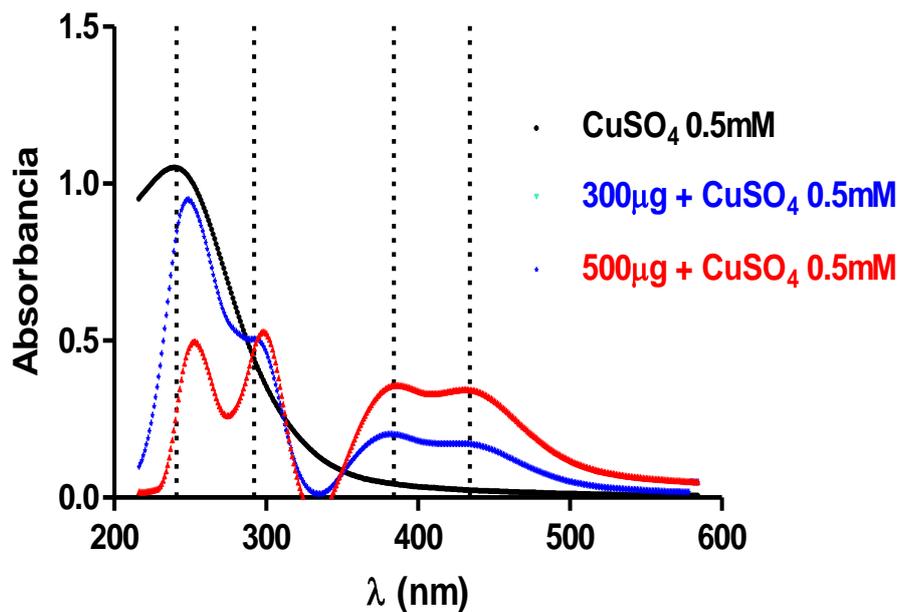


Figura 7. Espectro experimental de absorción de la solución de CuSO_4 0.5mM en presencia del extracto *Rosmarinus officinalis*. Las condiciones de ensayo están descritas en Métodos.

Tabla 3. Picos de absorción máxima de CuSO_4 en presencia de *Rosmarinus officinalis*.

Longitud de onda	241nm	292nm	384nm	434nm
CuSO_4 0.5mM	1.051 ± 0.065	-----	-----	-----
<i>Rosmarinus officinalis</i> 300µg + CuSO_4	0.849 ± 0.008	0.506 ± 0.008	0.201 ± 0.002	0.171 ± 0.003
<i>Rosmarinus officinalis</i> 500µg + CuSO_4	0.496 ± 0.003	0.528 ± 0.008	0.351 ± 0.004	0.342 ± 0.005

Los valores representan el promedio de al menos cuatro determinaciones independientes ± D.E.

N-desmetilación de aminopirina

Existen antecedentes que extractos de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* presentan actividades psicotrópicas, muchas de las cuales son desarrolladas por aminas [15, 17]. Es por ello que nos interesó determinar el efecto que estos extractos herbales podían desarrollar sobre la actividad N-desmetilante del sistema oxidativo del citocromo P450, el cual cataliza la oxidación de diversos compuestos lipofílicos, entre ellos aminas sustituidas.

La N-desmetilación de aminopirina es una reacción catalizada por el sistema citocromo P450 microsómico. Producto de esta reacción se libera formaldehído, el cual, al conjugarse con 2,4-pentanediona forma un conjugado de color amarillo que absorbe a 414nm. La linealidad del método se determinó realizando una curva estándar donde el valor de R² obtenido fue de 0.9972.

Ambos extractos herbales disminuyeron la actividad N-desmetilante del sistema citocromo P450; el extracto de *Melissa officinalis* disminuyó la actividad control (3.5nm de HCHO/min/mg de proteína microsómica) un 23% y el de *Rosmarinus officinalis*, un 43% (Figura 8).

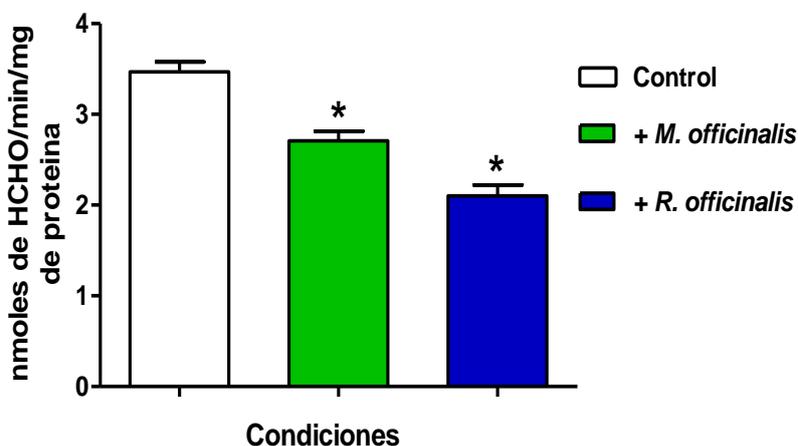


Figura 8. N-desmetilación de aminopirina. [*Melissa officinalis*]: 50µg/mg de proteína microsómica; [*Rosmarinus officinalis*]: 50µg/mg de proteína microsómica. Las condiciones del ensayo están descritas en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes ± E.E. (*) Valores significativamente diferentes al control.

B. Evaluación conductual de los animales

Parámetros de semiología clínica para la evaluación de la toxicidad aguda de los extractos de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis*

Los estudios preclínicos en animales, nos permiten determinar la eficacia y seguridad de los compuestos en estudio. Para determinar la seguridad, es necesario hacer estudios toxicológicos que nos den información de los efectos secundarios que pueden producirse en un ser vivo. Así, se determinó la toxicidad aguda tras la administración de las dosis de los extractos a las ratas. El objetivo fue obtener datos sobre los efectos producidos en el animal después de una única exposición del fitofármaco. Para esto se observaron a los animales después de 30min de administrado el extracto herbal según los siguientes parámetros:

- Pérdida de peso.
- Aspecto: si el pelaje presenta un aspecto normal, en mal estado, con secreciones oculares y/o nasales o si presenta una postura anormal.
- Comportamiento espontáneo: si es normal, si presenta pequeños cambios, inactividad, automutilación, vocalización anormal, hiperactividad.
- Comportamiento en respuesta a la manipulación: si es normal, si presenta pequeños cambios, cambios moderados, agresividad o animal comatoso.
- Constantes vitales: si es normal, si hay cambios notorios en la temperatura corporal, frecuencia cardiaca o respiratoria.
- Mortalidad.

Al realizar el examen semiológico de las ratas controles y de las que recibieron el tratamiento con los extractos herbales, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros medidos.

Actividad motora espontánea

Actividad motora total

Los efectos totales de la administración i.p. de los extractos secos de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* en la actividad motora total durante el periodo de 30min se observan en la Figura 6. El análisis de varianza ANOVA de una vía muestra una disminución significativa de la actividad motora de las ratas provocada por la administración de *Melissa officinalis* $F(5,42)=19.24$ ($p<0.0001$), y *Rosmarinus officinalis* $F(5,42)=17.85$ ($p<0.0001$).

El análisis de los resultados experimentales a través de Newman-Keuls mostró que los extractos provocaron una disminución significativa de la actividad motora en todas las dosis testeadas excepto, por la dosis 6.25mg/kg de *Melissa officinalis* que no muestra una diferencia significativa respecto del control. Por otra parte, el efecto producido por las dosis mayores de *Melissa officinalis* (25 y 50mg/kg) y *Rosmarinus officinalis* (12.5, 25 y 50mg/kg) no fue significativamente diferente a diazepam 1mg/kg (Figura 9 y 10).

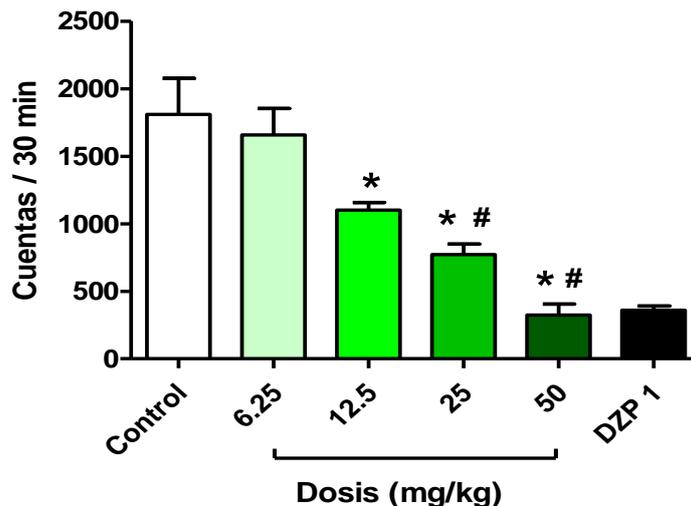


Figura 9. Actividad Motora Espontánea Total de animales tratados con el extracto seco de *Melissa officinalis*. Los valores representan el promedio de 8 mediciones por cada grupo + E.E. (*) Valores significativamente diferentes a la condición salina (control) ($p < 0.05$). (#) Valores significativamente iguales a dosis de diazepam (DZP) 1mg/kg ($p > 0.05$). Valores p obtenidos del ANOVA seguido por el test multicomparativo de Newman-Keuls.

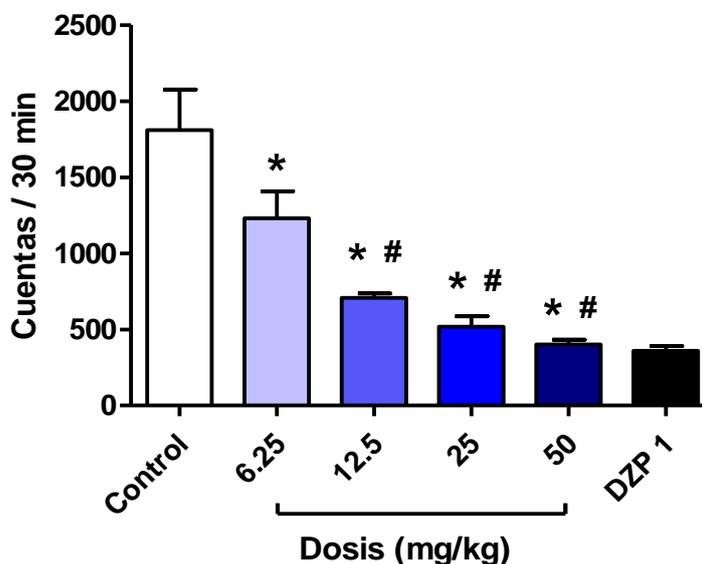


Figura 10. Actividad Motora Espontánea total en animales tratados con extracto seco de *Rosmarinus officinalis*. Los valores representan el promedio de 8 mediciones por cada grupo + E.E. (*) Valores significativamente diferentes a la condición salina (control) ($p < 0.05$). (#) Valores significativamente iguales a dosis de diazepam (DZP) 1mg/kg ($p > 0.05$). Valores p obtenidos del ANOVA seguido por el test multicomparativo de Newman-Keuls.

Tiempo de acicalamiento

El tiempo que cada rata utilizó para acicalarse también fue registrado, y así también se observó a través del ANOVA de una vía un efecto significativo en la disminución del tiempo de acicalamiento utilizado por las ratas, tanto para la administración de *Melissa officinalis* $F(5,42)=4.907$ ($p<0.005$), como de *Rosmarinus officinalis* $F(5,42)=5.501$ ($p<0.005$) (Figura 11 y 12).

El análisis posterior de Newman-Keuls indica que las dosis mayores de ambos extractos (12.5, 25 y 50mg/kg) muestran un efecto significativo diferente a la condición control salina, a la vez que las dosis mayores de *Melissa officinalis* (25 y 50mg/kg) y de *Rosmarinus officinalis* (12.5, 25 y 50mg/kg) mostraron ser significativamente iguales al efecto producido por diazepam (Figura 11 y 12).

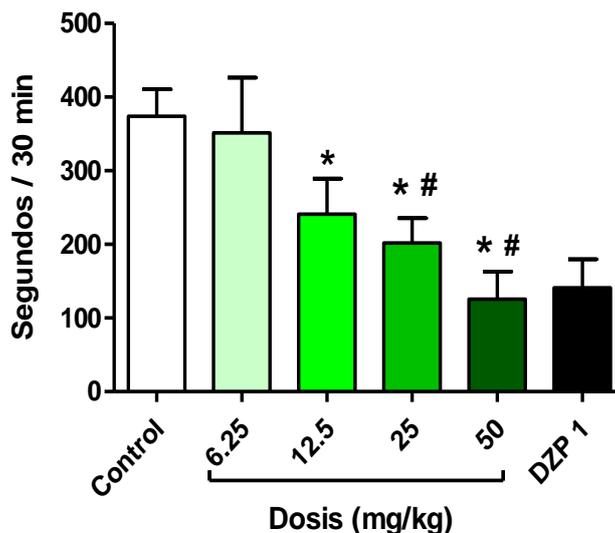


Figura 11. Tiempo de acicalamiento en animales tratados con extracto seco de *Melissa officinalis*. Los valores representan el promedio de 8 mediciones por cada grupo + E.E. (*) Valores significativamente diferentes a la condición salina (control) ($p < 0.05$). (#) Valores significativamente iguales a dosis de diazepam (DZP) 1mg/kg ($p > 0.05$). Valores p obtenidos del ANOVA seguido por el test multicomparativo de Newman-Keuls.

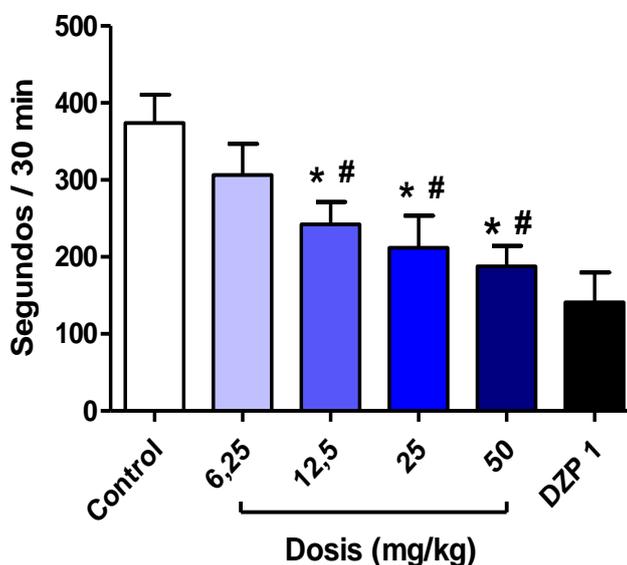


Figura 12. Tiempo de acicalamiento en animales tratados con extracto seco de *Rosmarinus officinalis*. Los valores representan el promedio de 8 mediciones por cada grupo + E.E. (*) Valores significativamente diferentes a la condición salina (control) ($p < 0.05$). (#) Valores significativamente iguales a dosis de diazepam (DZP) 1mg/kg ($p > 0.05$). Valores p obtenidos del ANOVA seguido por el test multicomparativo de Newman-Keuls.

Levantamiento de la rata en sus patas traseras

Respecto del número de veces que las ratas se levantaron en sus patas traseras, el análisis de una vía ANOVA mostró un efecto significativo en la disminución del número de levantadas en las patas traseras tanto para la administración de *Melissa officinalis* $F(5,42)=14.53$ ($p<0.0001$), como para la de *Rosmarinus officinalis* $F(5,42)=11.15$ ($p<0.0001$) (Figura 13 y 14).

Así también el análisis *post hoc* de Newman-Keuls mostró que las dosis mayores de *Melissa officinalis* (12.5, 25 y 50mg/kg) y todas las dosis de *Rosmarinus officinalis*, produjeron un efecto significativo en la disminución del número de levantadas comparable a la condición salina, mientras el efecto de la administración de las dosis medias de *Melissa officinalis* (12.5 y 25mg/kg) y de las dosis mayores de *Rosmarinus officinalis* (12.5, 25 y 50mg/kg), fue igual al efecto producido por diazepam. Curiosamente, se observó que el efecto producido por la dosis 50mg/kg de *Melissa officinalis* fue significativamente diferente a la condición salina y a diazepam, lo que muestra una mayor potencia sobre la disminución en el número de levantadas en las patas traseras (Figura 13 y 14).

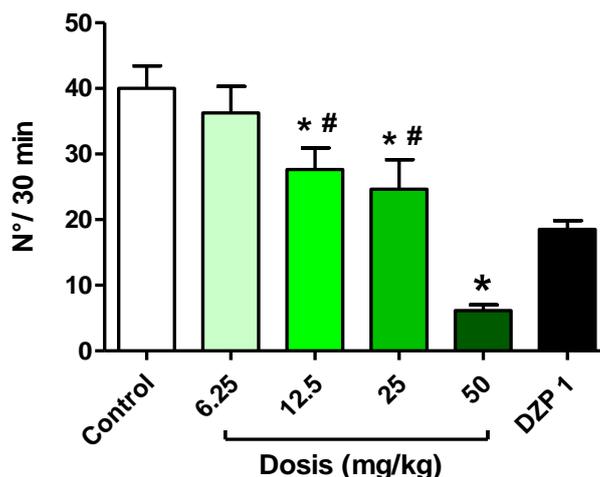


Figura 13. Levantadas en patas traseras en animales tratados con extracto seco de *Melissa officinalis*. Los valores representan el promedio de 8 mediciones por cada grupo + E.E. (*) Valores significativamente diferentes a la condición salina (control) ($p < 0.05$). (#) Valores significativamente iguales a dosis de diazepam (DZP) 1mg/kg ($p > 0.05$). Valores p obtenidos del ANOVA seguido por el test multicomparativo de Newman-Keuls.

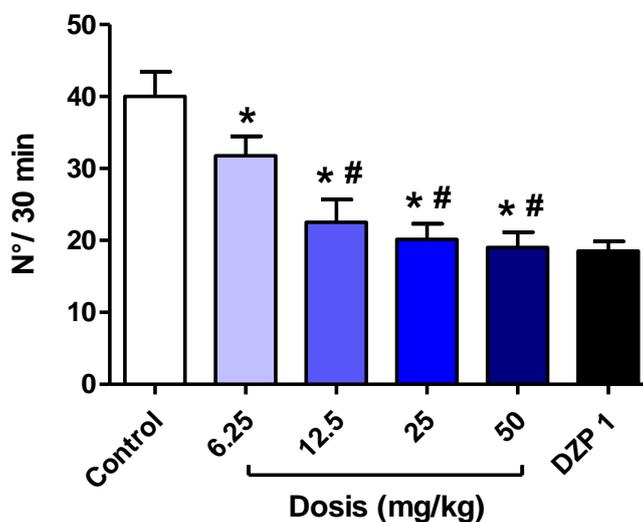


Figura 14. Levantadas en patas traseras en animales tratados con extracto seco de *Rosmarinus officinalis*. Los valores representan el promedio de 8 mediciones por cada grupo + E.E. (*) Valores significativamente diferentes a la condición salina (control) ($p < 0.05$). (#) Valores significativamente iguales a dosis de diazepam (DZP) 1mg/kg ($p > 0.05$). Valores p obtenidos del ANOVA seguido por el test multicomparativo de Newman-Keuls.

Laberinto en cruz elevado

El análisis de varianza de una vía ANOVA de los resultados indica que se produce un aumento significativo sobre el porcentaje de entradas a los brazos abiertos del laberinto tanto con la administración de *Melissa officinalis* $F(5,42)=19.03$ ($p<0.0001$), como de *Rosmarinus officinalis* $F(5,42)=17.31$ ($p<0.0001$) (Figura 15 y 16).

Así también, el análisis de una vía ANOVA mostró un efecto significativo sobre el tiempo de permanencia en los brazos abiertos luego de la administración de *Melissa officinalis* $F(5,42)=17.64$ ($p<0.0001$), y de *Rosmarinus officinalis* $F(5,42)=5.109$ ($p<0.005$) (Figura 17 y 18).

El análisis posterior de Newman-Keuls indica que el efecto de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* sobre la entrada en los brazos abiertos y el tiempo de permanencia en estos, sólo se evidencia con las dosis mayores (50mg/kg). También se observa que no hay diferencia significativa en el efecto producido por la dosis de *Rosmarinus officinalis* 50mg/kg comparado a diazepam tanto para la entrada a los brazos abiertos como en el tiempo de permanencia en esto (Figura 15-18).

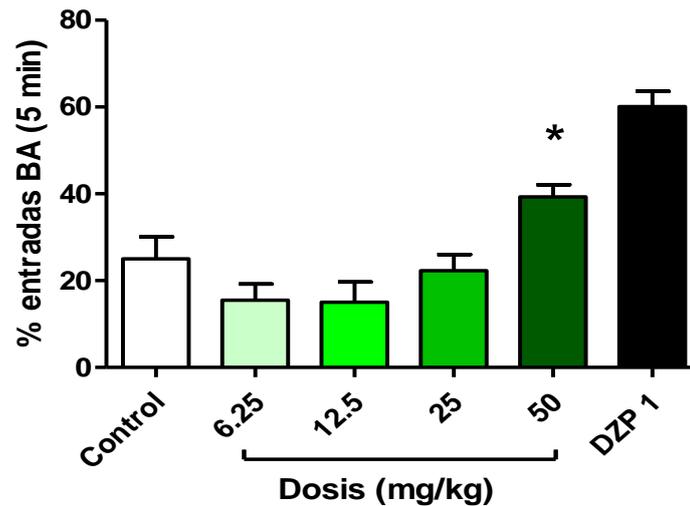


Figura 15. Porcentaje de entradas en brazos abiertos en animales tratados con extracto seco de *Melissa officinalis*. Los valores representan el promedio de 8 mediciones por cada grupo + E.E. (*) Valores significativamente diferentes a la condición salina (control) ($p < 0.05$). (#) Valores significativamente iguales a dosis de diazepam (DZP) 1mg/kg ($p > 0.05$). Valores p obtenidos del ANOVA seguido por el test multicomparativo de Newman-Keuls.

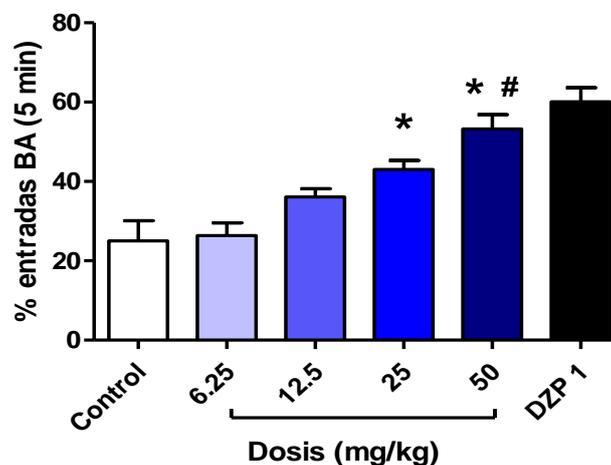


Figura 16. Porcentaje de entradas en brazos abiertos en animales tratados con extracto seco de *Rosmarinus officinalis*. Los valores representan el promedio de 8 mediciones por cada grupo + E.E. (*) Valores significativamente diferentes a la condición salina (control) ($p < 0.05$). (#) Valores significativamente iguales a dosis de diazepam (DZP) 1mg/kg ($p > 0.05$). Valores p obtenidos del ANOVA seguido por el test multicomparativo de Newman-Keuls.

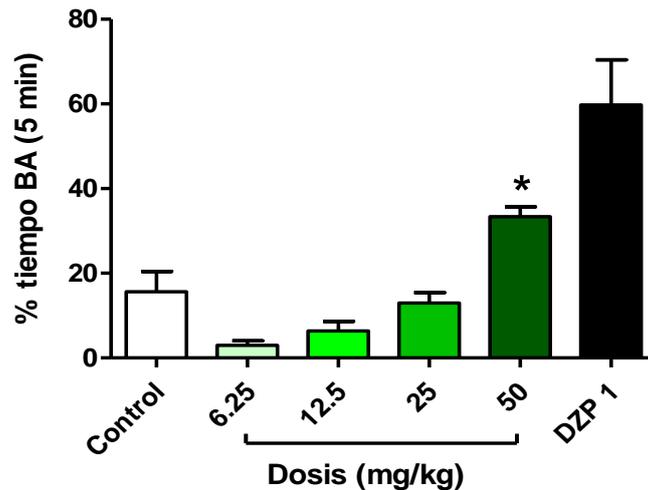


Figura 17. Porcentaje tiempo de permanencia en brazos abiertos en animales tratados con extracto seco de *Melissa officinalis*. Los valores representan el promedio de 8 mediciones por cada grupo + E.E. (*) Valores significativamente diferentes a la condición salina (control) ($p < 0.05$). (#) Valores significativamente iguales a dosis de diazepam (DZP) 1mg/kg ($p > 0.05$). Valores p obtenidos del ANOVA seguido por el test multicomparativo de Newman-Keuls.

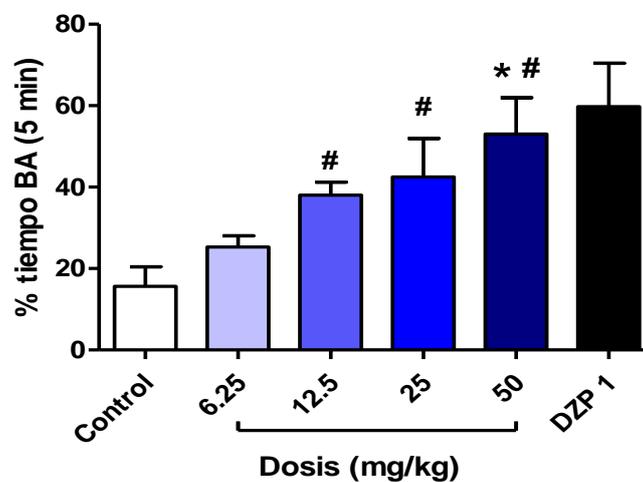


Figura 18. Porcentaje tiempo de permanencia en brazos abiertos en animales tratados con extracto seco de *Rosmarinus officinalis*. Los valores representan el promedio de 8 mediciones por cada grupo + E.E. (*) Valores significativamente diferentes a la condición salina (control) ($p < 0.05$). (#) Valores significativamente iguales a dosis de diazepam (DZP) 1mg/kg ($p > 0.05$). Valores p obtenidos del ANOVA seguido por el test multicomparativo de Newman-Keuls.

Relación entre la actividad antioxidante y el efecto ansiolítico

Como una forma de medir la relación existente entre la actividad antioxidante biológica y el efecto ansiolítico observado, se calculó la razón entre los parámetros ensayados (actividad antioxidante y ensayos conductuales) en presencia del extracto de *Melissa officinalis* versus *Rosmarinus officinalis*.

El extracto de *Rosmarinus officinalis* presentó una concentración 4.3 veces mayor de polifenoles en comparación al extracto de *Melissa officinalis*. Asimismo, los valores del EC₅₀ obtenidos de los ensayos de la prevención de la oxidación de los lípidos y tioles de la membrana microsómica para el extracto de *Melissa officinalis* fueron 6.4 y 2.8 veces superiores, respectivamente, a los del extracto de *Rosmarinus officinalis*.

Los ensayos conductuales orientados a evaluar actividad ansiolítica se realizaron mediante el test del laberinto en cruz elevado. El incremento en el número de entradas a los brazos abiertos y también en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto responde a una actividad ansiolítica [29, 30]. Ambas mediciones mostraron que el extracto de *Rosmarinus officinalis* presentaba un efecto ansiolítico aproximadamente 1.5 veces superior al del extracto de *Melissa officinalis*.

Tabla 4. Razón de los resultados obtenidos entre los extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Melissa officinalis*.

Parámetros ensayados	<i>Rosmarinus officinalis</i> <i>Melissa officinalis</i>
¹ Concentración de polifenoles	4.3
² Efecto antilipoperoxidativo	6.4
² Prevención de oxidación de tioles microsómicos	2.8
³ Disminución de tioles microsómicos en presencia de iones Cu ²⁺	2.0
⁴ Actividad ansiolítica: Incremento en el número de entradas a los brazos abiertos del laberinto	1.4
⁴ Actividad ansiolítica: Incremento en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto	1.6

¹Valor calculado a partir de los datos de la tabla 1.

²Valores calculados a partir de los EC₅₀ obtenidos de la prevención de la oxidación de lípidos y tioles microsómicos (Figuras 1 - 4).

³Valor obtenido de los ensayos de quelación de Cu²⁺ por microsomas de acuerdo a los datos obtenidos en la figura 5.

⁴Valores calculados a partir de los efectos máximos, los cuales fueron obtenidos a la dosis máxima ensayada de ambos extractos, 50mg/Kg (Figuras 15 - 18).

IV. DISCUSIÓN

La medicina popular, a lo largo de la historia ha utilizado diferentes tipos de plantas para tratar diversas dolencias y enfermedades [18]. Particularmente, preparados de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* han mostrado tener efectos psicotrópicos [17, 22], lo que implica la presencia de compuestos lipofílicos capaces de atravesar la barrera hemato-encefálica. Al respecto, los extractos secos estandarizados de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* inhibieron la *N*-desmetilación de aminopirina, reacción catalizada por el sistema oxidativo del citocromo P450 (Figura 8). Este sistema metaboliza compuestos lipofílicos, y si los extractos fueron capaces de inhibir la actividad de este sistema, ello indicaría la presencia en nuestros extractos de este tipo de compuestos. Si bien este experimento nos permite afirmar que existirían compuestos lipofílicos en los extractos, cabe preguntarse: ¿Esta inhibición provocará un efecto adverso debido a un aumento de la concentración plasmática de los principios activos involucrados? Al respecto podemos comentar que las dosis de diazepam usadas en humanos (4 – 20mg por día) provoca deterioro de las habilidades motoras. Sin embargo, no existen antecedentes de efectos adversos observados de estos extractos ni tampoco interacciones medicamentosas con otros fármacos sintéticos con estos extractos. Sólo existe información recolectada a través de farmacovigilancia de pacientes que tomaron estos fitofármacos, los cuales no manifestaron sufrir efecto adverso alguno (datos no publicados).

El cerebro, corresponde sólo al 2% del peso corporal de una persona, sin embargo, consume aproximadamente el 20% del oxígeno circulante. Además, los tejidos cerebrales son ricos en lípidos y tiene mecanismos antioxidantes deficientes, por lo tanto, el cerebro está expuesto a un alto riesgo de daño generado por estrés oxidativo [31]. Se ha descrito en la literatura que un gran número de patologías psiquiátricas y neurodegenerativas están asociadas a estrés oxidativo [1, 3, 12]. Los extractos secos de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis*, inhibieron la lipoperoxidación de microsomas hepáticos de rata, indicando la presencia de compuestos antioxidantes en los extractos (Figura 1 y 2). Los extractos herbales, especialmente aquellos provenientes de hojas, poseen altas concentraciones de polifenoles, compuestos de reconocida

actividad antioxidante. Los mecanismos antioxidantes involucrados son muy variados: atrapamiento de radicales libres, quelación de metales, inducción de enzimas antioxidantes, etc [32]. De esto se deduce que el aporte verdadero de estos preparados herbales a la capacidad antioxidante celular es sólo medible *in vivo*, ya que, las mediciones *in vitro* son limitadas; por ejemplo, no se puede medir *in vitro* inducción enzimática.

Cabe señalar además, que los extractos secos utilizados en este trabajo están diluidos al 20% aproximadamente (información de la empresa). Por lo tanto, las concentraciones de los extractos mencionadas en los gráficos de los experimentos conductuales deberían ser reducidas a un quinto del valor indicado. Por otra parte, el proceso de extracción utiliza las propiedades fisicoquímicas de la droga vegetal y no sus características biológicas, razón por la cual en ellos existen principios activos así como también principios que no poseen esta característica. Estos antecedentes hacen difícil la comparación de la eficacia del compuesto sintético con el fitofármaco.

Por otra parte, se ha observado acumulación de iones metálicos en neuronas de pacientes que presentan la enfermedad de Alzheimer [8] y la enfermedad de Parkinson [8]. Estos iones son capaces de inducir la generación de especies radicalarias del oxígeno [10, 11] y unirse a residuos aminoácidos que contienen oxígeno, nitrógeno y/o azufre [24]. Ambos fenómenos están involucrados en la toxicidad de iones metálicos libres presentes en la célula. Los extractos secos de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* fueron capaces de interactuar con iones Cu^{+2} (Figura 6 y 7), lo que sumado a su actividad antioxidante reflejada en la inhibición de la oxidación de lípidos y tioles de la membrana microsómica (Figura 3, 4 y 5), garantiza la capacidad protectora celular de estos extractos.

Asimismo, se ha descrito que los trastornos afectivos como depresión y ansiedad también están asociados a estrés oxidativo [32]. *Melissa officinalis* ha sido ampliamente descrita como ansiolítico [17]; sin embargo, son escasos los estudios acerca de las propiedades psicotrópicas de *Rosmarinus officinalis*. Es por ello que se realizaron estudios conductuales para medir el efecto ansiolítico para posteriormente evaluar la posible asociación entre este efecto y el efecto antioxidante de los extractos.

La actividad ansiolítica fue evaluada en ratas Sprague Dawley a través del método del Laberinto en cruz elevado [29]. Así, el incremento en el número de entradas a los brazos abiertos y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto fue mayor en presencia del extracto de *Rosmarinus officinalis* que en presencia de *Melissa officinalis* (Figuras 15 - 18). Similar diferencia fue obtenida en los ensayos de actividad antioxidante (Figuras 1 - 5).

La actividad ansiolítica observada de ambos extractos podría deberse a la presencia en ellos de principios activos que interactúan directamente con receptores GABAérgicos. Existen antecedentes que demuestran que ciertos componentes presentes en *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis*, como por ejemplo el ácido rosmarínico, poseen un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima GABA-T [34]. Esto aumentaría la disponibilidad de GABA a nivel cerebral contribuyendo con ello a la disminución de la ansiedad en el paciente.

Por otra parte, ambos extractos produjeron una disminución equivalente en la actividad motora total, medida como la disminución en el número de levantamientos en las patas traseras y la disminución en el tiempo de acicalamiento. Interesantemente, en este caso el efecto fue mayor en las ratas tratadas con *Melissa officinalis* (Figuras 9 – 14). Estos resultados parecen indicar que el extracto de *Melissa officinalis* posee un mayor efecto sedativo que el extracto de *Rosmarinus officinalis*. Cabe señalar que el efecto sedativo se produce a causa de una potenciación del efecto inhibitorio de GABA a nivel de los receptores GABA_A, específicamente en el subtipo de receptor $\alpha 1$ [35]. Dado que los resultados indican que ambos extractos provocan un efecto sedativo comparable a diazepam, se postula la presencia de compuestos capaces de actuar a nivel de los receptores GABA_A.

Las características farmacológicas observadas de ambos extractos: su actividad antioxidante y su efecto ansiolítico nos permiten proponer a los extractos secos de *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis* como base para la formulación de fitofármacos ansiolíticos. Más aún, las dosis utilizadas en los estudios conductuales, no mostraron efectos adversos, estos medidos a través de

cambios en los parámetros de semiología clínica (aspecto del pelaje, comportamiento espontáneo, constantes vitales, etc.) (Datos no mostrados).

Los experimentos conductuales muestran que el efecto producido por las dosis 25 y 50mg/kg del extracto de *Rosmarinus officinalis* es igual entre ellos (figuras 16 y 18). Más aún, el efecto ansiolítico provocado por ambas dosis no fue significativamente diferente al provocado por diazepam, lo cual indicaría, en estas condiciones, una eficacia similar a la de diazepam. Comparativamente, el comportamiento ansiolítico provocado por el extracto de *Melissa officinalis* fue lineal, es decir, dosis – respuesta, y en las dosis ensayadas el efecto ansiolítico máximo no fue alcanzado (figuras 15 y 17).

Cabe destacar que los tratamientos clásicos utilizados en pacientes que presentan enfermedades psicotrópicas provocan efectos adversos de nivel moderado, lo cual afecta la calidad de vida de los pacientes. La administración de co-terapias con los extractos herbales estudiados en este trabajo podría ayudar a disminuir las dosis de los fármacos sintéticos actualmente en uso y a reducir los efectos adversos de los mismos. Investigaciones conducentes a establecer la posología y la elaboración de un nuevo fitofármaco están en curso. La obtención del fitofármaco permitirá la evaluación clínica del mismo para confirmar su eficacia y seguridad.

V. CONCLUSIONES

- 1) El extracto seco de *Rosmarinus officinalis* presentó una mayor cantidad de polifenoles, así como también una mayor actividad antioxidante medida como la capacidad de prevenir la oxidación de lípidos y tioles microsómicos, en comparación al extracto de *Melissa officinalis*.
- 2) Ambos extractos fueron capaces de quelar Cu^{2+} , actividad medida como su capacidad de disminuir los tioles microsómicos y alterar el espectro de absorbancia del Cu^{2+} .
- 3) El efecto ansiolítico de *Rosmarinus officinalis*, medido como aumento en el número de entradas y en el tiempo de permanencia a los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado, fue mayor en comparación a *Melissa officinalis*.

VI. Referencias

- [1] I. C. K. Wong, M. L. Murray, D. Camilleri-Novak, and P. Stephens, "Increased prescribing trends of paediatric psychotropic medications", *Arch. Dis. Child.*, vol. 89, no. 12, pp. 1131–1132, 2004.
- [2] World Health Organization, *Pharmacological treatment of mental disorders in primary health care*. World Health Organization, 2009.
- [3] N. Felicity, M. Berk, O. Dean, and A. I. Bush, "Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications", *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, vol. 11, no. 6, pp. 851–76, Sep. 2008.
- [4] B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview", *Methods Enzymol.*, vol. 186, pp. 1–85, 1990.
- [5] A. Sarandol, E. Sarandol, S. S. Eker, S. Erdinc, E. Vatansever, and S. Kirli, "Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: Short-term antidepressant treatment does not alter oxidative - Antioxidative systems", *Hum. Psychopharmacol.*, vol. 22, no. 2, pp. 67–73, 2007.
- [6] M. Bilici, H. Efe, M. A. Koroğlu, H. A. Uydu, M. Bekaroğlu, and O. Değer, "Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: Alterations by antidepressant treatments", *J. Affect. Disord.*, vol. 64, no. 1, pp. 43–51, 2001.
- [7] S. Ersan, S. Bakir, E. Erdal Ersan, and O. Dogan, "Examination of free radical metabolism and antioxidant defence system elements in patients with obsessive-compulsive disorder", *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, vol. 30, no. 6, pp. 1039–42, Aug. 2006.
- [8] S. Rivera-Mancía, I. Pérez-Neri, C. Ríos, L. Tristán-López, L. Rivera-Espinosa, and S. Montes, "The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases", *Chem. Biol. Interact.*, vol. 186, no. 2, pp. 184–99, Jul. 2010.

- [9] M. E. Letelier, a. M. Lepe, M. Faúndez, J. Salazar, R. Marín, P. Aracena, and H. Speisky, "Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity", *Chem. Biol. Interact.*, vol. 151, no. 2, pp. 71–82, 2005.
- [10] F. Haber and J. Weiss, "The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts", *Proc. R. Soc. London. Ser. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 147, no. 861, pp. 332–351, 1934.
- [11] H. J. H. Fenton, "Oxidation of tartaric acid in presence of iron", *J. Chem. Soc.*, vol. 65, pp. 899–910, 1894.
- [12] A. Melo, L. Monteiro, R. M. F. Lima, D. M. de Oliveira, M. D. de Cerqueira, and R. S. El-Bachá, "Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives", *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2011, p. 467180, Jan. 2011.
- [13] Z. J. Zhang, "Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders", *Life Sciences*, vol. 75, no. 14. pp. 1659–1699, 2004.
- [14] Y. Birdane, M. Büyüjokuroglu, F. Birdane, M. Cemek, and H. Yavuz, "Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Melissa officinalis* L. in rodents", *Rev. médecine Vet.*, vol. 158, no. 2, pp. 75–81, 2007.
- [15] M. E. González-Trujano, E. I. Peña, a L. Martínez, J. Moreno, P. Guevara-Fefer, M. Déciga-Campos, and F. J. López-Muñoz, "Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents", *J. Ethnopharmacol.*, vol. 111, no. 3, pp. 476–82, May 2007.
- [16] O. Muñoz, M. Montes, and T. Wilkomirsky, *Plantas medicinales de uso en Chile. Química y Farmacología*. 2001.
- [17] A. E. Taiwo, F. B. Leite, G. M. Lucena, M. Barros, D. Silveira, M. V Silva, and V. M. Ferreira, "Anxiolytic and antidepressant-like effects of *Melissa*

officinalis (lemon balm) extract in rats: Influence of administration and gender”, *Indian J. Pharmacol.*, vol. 44, no. 2, pp. 189–92, Mar. 2012.

- [18] J. Alonso, *Tratado de fitofármacos y nutraceuticos*, 1st ed. Corpus, 2007.
- [19] G. Díaz-Véliz, M. A. Vásquez, and S. Mora, “Anxiolytic and antidepressant effects of the hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* (rosemary) in rats”, in *XVIII Congress of the Latin American Pharmacological Society*, 2008, p. 153.
- [20] M. S. Rajput, S. Sinha, V. Mathur, and P. Agrawal, “Herbal Antidepressants”, *Int. J. Pharm. Front. Res.*, vol. 1, no. June, pp. 159–169, 2011.
- [21] M. E. Letelier, J. F. Cortes, A. M. Lepe, J. a Jara, A. Molina-berríos, C. Rodriguez, P. Iturra-montecinos, and M. Faúndez, “Evaluation of the antioxidant properties and effects on the biotransformation of commercial herbal preparations using rat liver endoplasmic reticulum”, *Boletín Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromáticas*, vol. 8, no. 2, pp. 110–120, 2009.
- [22] M. E. Letelier, A. Terán, M. a. Barra, and P. Aracena-Parks, “Antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* and its effects on xenobiotic biotransformation”, *Bol. Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromat.*, vol. 8, no. 6, pp. 487–497, 2009.
- [23] Committee on Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience and Behavioral Research (National Research Council), *Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research*. Washington DC, 2003.
- [24] M. E. Letelier, S. Sánchez-Jofré, L. Peredo-Silva, J. Cortés-Troncoso, and P. Aracena-Parks, “Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects”, *Chem. Biol. Interact.*, vol. 188, no. 1, pp. 220–227, 2010.

- [25] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *J. Biol. Chem.*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, Mar. 1951.
- [26] M. E. Letelier, A. Molina-Berríos, J. Cortés-Troncoso, J. Jara-Sandoval, M. Holst, K. Palma, M. Montoya, D. Miranda, and V. González-Lira, "DPPH and oxygen free radicals as pro-oxidant of biomolecules", *Toxicol. Vitr.*, vol. 22, no. 2, pp. 279–286, 2008.
- [27] M. E. Letelier, M. Faúndez, J. Jara-Sandoval, A. Molina-Berríos, J. Cortés-Troncoso, P. Aracena-Parks, and R. Marín-Catalán, "Mechanisms underlying the inhibition of the cytochrome P450 system by copper ions", *J. Appl. Toxicol.*, vol. 29, no. 8, pp. 695–702, 2009.
- [28] P. V Turner, T. Brabb, C. Pekow, and M. a Vasbinder, "Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider", *J Am Assoc Lab Anim Sci*, vol. 50, no. 5, pp. 600–613, 2011.
- [29] S. Pellow, P. Chopin, S. E. File, and M. Briley, "Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat", *J. Neurosci. Methods*, vol. 14, pp. 149–167, 1985.
- [30] S. Pellow and S. E. File, "Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat", *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 24, no. 3, pp. 525–9, Mar. 1986.
- [31] E. Guney, M. Fatih Ceylan, A. Tektas, M. Alisik, M. Ergin, Z. Goker, G. Senses Dinc, O. Ozturk, A. Korkmaz, S. Eker, M. Kizilgun, and O. Erel, "Oxidative stress in children and adolescents with anxiety disorders", *J. Affect. Disord.*, vol. 156, pp. 62–66, 2014.
- [32] C. G. Fraga, M. Galleano, S. V. Verstraeten, and P. I. Oteiza, "Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols", *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 31, no. 6. Elsevier Ltd, pp. 435–445, 2010.

- [33] J. Bouayed, H. Rammal, C. Younos, and R. Soulimani, "Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice", *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 564, no. 1–3, pp. 146–149, Jun. 2007.
- [34] R. Awad, D. Levac, P. Cybulska, Z. Merali, V. L. Trudeau, and J. T. Arnason, "Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the γ - aminobutyric acid (GABA) system", *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 85, no. 9, pp. 933–942, Sep. 2007.
- [35] R. M. McKernan, T. W. Rosahl, D. S. Reynolds, C. Sur, K. a Wafford, J. R. Atack, S. Farrar, J. Myers, G. Cook, P. Ferris, L. Garrett, L. Bristow, G. Marshall, a Macaulay, N. Brown, O. Howell, K. W. Moore, R. W. Carling, L. J. Street, J. L. Castro, C. I. Ragan, G. R. Dawson, and P. J. Whiting, "Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype", *Nat. Neurosci.*, vol. 3, no. 6, pp. 587–592, 2000.