



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO TEMPORAL DE LA COMPOSICIÓN
QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Litsea glaucescens*
Y EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE
SUS VOLÁTILES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

JESSICA KARINA DÍAZ CANTÓN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. SILVIA LAURA GUZMÁN GUTIÉRREZ



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 2-4 A del Departamento de
Productos Naturales del Instituto de Química, UNAM, cuyo
responsable es el Dr. Ricardo Reyes Chilpa

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT DGAPA UNAM) IN 210016 “Bioprospección de la flora mexicana para la búsqueda de nuevos compuestos con posibles actividades antiviral (VIH-1), antifúngica y antitumoral” por los fondos otorgados para la realización de esta tesis y la beca otorgada.

Al proyecto “Nuevas Alternativas de Tratamiento para Enfermedades Infecciosas” del Instituto de Investigaciones de Biomédicas.

Al Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y la Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC) del Instituto de Química, UNAM.

Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Investigador Titular B y titular laboratorio 2-4 A del Instituto de Química UNAM.

A la M. en C. Mayra León Santiago, M. en C. Everardo Tapia M. y a la Dra. Marisol Reyes Lezama por su asesoría en la realización de los análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

A la Dra. Mayra Silva Miranda, Investigadora Catedrática CONACyT-IIB, UNAM, por su apoyo en la realización de los experimentos con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

A la Dra. Nelly del Carmen Jiménez Pérez por su asesoría en la colecta de los ejemplares vegetales.

Al comité revisor de esta tesis:

Dra. Helia Reyna Osuna Fernández

Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez

Dra. Josefina Herrera Santoyo

M. en C. Mayra León Santiago

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mamá por brindarme todas las herramientas necesarias para titularme, por su paciencia, amor y apoyo incondicional al saber que sería científica.

A mí hermana por estar conmigo en todo momento, por el buen ejemplo que toda mi vida me ha dado, por su apoyo y amor.

A mí novio Said, por alentarme a ser mejor cada día, por su amor, paciencia y momentos increíbles durante la carrera.

A Guille por ser mi segunda madre, por su dedicación y sobre todo por su amor.

Al señor Alberto Serrano, por ser la figura paterna que necesite toda mi vida, por todo el apoyo ante situaciones difíciles, tiempo dedicado para escucharme y por procurar darme siempre lo mejor, pero sobre todo por tanto cariño.

A mis amigos Ale, Karina y Hugo por hacerme más amena la licenciatura por apoyarme en los momentos más difíciles de mi vida y por todos los momentos de felicidad que compartimos.

A mi tutora Laura, por la confianza de llevar a cabo este proyecto, por todos los conocimientos brindados y el tiempo dedicado para terminar esta tesis.

Al doctor Ricardo Reyes por abrirme las puertas de su laboratorio, por su asesoría, confianza y tiempo dedicado.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE CUADROS.....	VIIIVIII
ABREVIATURAS	IIX
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Principios de los ritmos biológicos.....	3
2.2 México y las plantas medicinales.....	4
2.3 Aceites esenciales	4
2.4 Depresión y tratamiento.....	5
III. ANTECEDENTES.....	6
3.1 Género <i>Litsea</i>	6
3.2 Aparición y primeros usos de <i>L. glaucescens</i> (Kunth).....	8
3.2 Usos medicinales de <i>Litsea glaucescens</i> (Kunt).....	8
3.3 Usos medicinales, culturales y gastronómicos en la actualidad	9
3.4 Estudios químicos y biológicos de <i>L. glaucescens</i> (Kunt)	9
IV. HIPÓTESIS.....	13
V. OBJETIVOS GENERALES.....	13
5.1 Objetivos particulares	13
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
6.1 Colecta y extracción del aceite esencial	14

6.2 Análisis químico del aceite esencial	15
6.3 Cuantificación de los compuestos en el aceite esencial	16
6.4 Análisis químico de los compuestos volátiles	17
6.5 Evaluación de la actividad antidepresiva	18
6.6 Pruebas conductuales	20
6.6.1 Nado forzado	20
6.6.2 Campo abierto	21
6.6.3 Evaluación de la actividad anti-micobacteriana	22
6.7 RESUMEN DEL MÉTODO	24
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
7.1 Rendimiento de los aceites esenciales	25
7.2 Composición química de los aceites esenciales	26
7.3 Análisis químico de los compuestos volátiles	31
7.4 Evaluación de la actividad biológica del aceite esencial	33
7.4.1 Administración del aceite esencial vía intraperitoneal	33
7.4.2 Aceite esencial administrado por vía inhalatoria	34
7.4.3 Evaluación de la actividad anti-micobacteriana	36
VIII. CONCLUSIONES	37
IX.PERSPECTIVAS	38
X. ANEXOS	39
XI. BIBLIOGRAFÍA	48

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Distribución de <i>Litsea</i> spp. en México y América Central.....	7
Figura 2. Fotografías de <i>Litsea glaucescens</i> (Kunth).....	8
Figura 3. Estructuras químicas de compuestos típicos aislados de plantas del género <i>Litsea</i>	10
Figura 4. Ejemplos de compuestos identificados mayoritarios del aceite esencial de <i>L. glaucescens</i> (Kunth)	12
Figura 5. Ejemplar de <i>L. glaucescens</i> (Kunth) (161833).....	14
Figura 6. Cromatograma del aceite esencial de <i>L. glaucescens</i> (Kunt).....	16
Figura 7. Imágenes del proceso de extracción mediante HS-SPME.....	18
Figura 8. Caja de administración del aceite esencial por vía inhalatoria.....	20
Figura 9. Ratones sometidos a la prueba de nado forzado.....	21
Figura 10. Ratón sometido a la prueba de campo abierto.....	22
Figura 11. Resumen del método para la evaluación de la composición química del aceite esencial, los compuestos volátiles de <i>L. glaucescens</i> y la evaluación de la actividad antidepresiva.....	24
Figura 12. Efecto del aceite esencial de <i>L. glaucescens</i> (AE) en ratones sometidos a la prueba de nado forzado... ..	33
Figura 13. Comparación del efecto del aceite esencial de <i>L. glaucescens</i> administrado por vía inhalatoria con los administrados por vía i.p., a ratones sometidos a la prueba de nado forzado.....	35
Figura 14. Efecto del aceite esencial de <i>L. glaucescens</i> administrado por vía inhalatoria en ratones sometidos a la prueba de campo abierto.....	35

Índice de cuadros

	Pág.
Cuadro 1. Composición química (% v/v) del aceite esencial foliar de las siete especies mexicanas de laurel.....	11
Cuadro 2. Rendimientos obtenidos de los aceites esenciales de tres colectas diferentes.....	25
Cuadro 3. Composición química en abundancias relativas (%) de los aceites esenciales de <i>L. glaucescens</i> en diferentes colectas.....	27
Cuadro 4. Concentración en µg/mL de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de <i>Litsea glaucescens</i>	29
Cuadro 5. Abundancia relativa de compuestos volátiles en plántulas sin ventilación.....	32

Abreviaturas

NOM- 059-ECOL-2012	Norma-059-ECOLOGICA-2012
Msnm	Metros sobre el nivel del mar
LANCIC	Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y la Conservación del Patrimonio Cultural
GC	Cromatografía de gases
MSD	Acoplada a espectrometría de Masas
Rt	Tiempo de retención
Ae	Aceite esencial
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
CD1	Cepa de ratones
UPEAL	Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco
NOM-062-ZOO-1999	Norma-062-ZOO-1999. ESPECIFICACIONES TECNICAS PARA LA PRODUCCION, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO
IMI	Imipramina
EEME	Error estándar de la media
ANOVA	Análisis de varianza
n	Número de muestras
mL	Mililitro
pH	Potencial de hidrogeno, medida de acidez o alcalinidad de una disolución.

<i>et al</i>	Expresión del latín, “ y otros”
°C	Grados centígrados
mg	Miligramos
µg	Microgramos
µL	Microlitros
g	Gramos
m	Metro
µm	Micrómetro
mg/kg	Miligramo por kilogramo

I. Resumen

La depresión es un trastorno mental común, se estima a nivel mundial que más de 300 millones de personas de todas las edades sufren de depresión y esta cifra se encuentra en aumento. Aunque existen tratamientos farmacológicos para la depresión menos de la mitad de los afectados reciben dichos tratamientos (OMS, 2017). Debido a esta situación, se han buscado nuevos medicamentos y desarrollado diferentes terapias para el tratamiento de esta enfermedad. Una alternativa es el uso de plantas medicinales para el tratamiento de este desorden.

El caso más conocido es la Hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*) sin embargo, hay otras especies en estudio como *Litsea glaucescens*, conocida como laurel, la cual es empleada por la etnia Mazahua de Atlacomulco para tratar la tristeza y el nerviosismo principalmente (Lozano-Mascarua, 1996). Nuestro grupo de investigación realizó en el 2012, estudios que avalan que el aceite esencial de laurel tiene potencial efecto antidepresivo, y en el 2015 se dieron a conocer dos compuestos del aceite esencial que son responsables de dicha actividad, el linalol y el β -pineno. Sin embargo, no se conoce en *L. glaucescens* si la composición química del aceite esencial se ve afectada por la temporalidad, si los compuestos volátiles de la planta tienen los mismos compuestos que el aceite esencial y si estos volátiles tienen actividad antidepresiva, es por esta razón que en el presente trabajo se evaluó si los compuestos del aceite esencial se modificaban de acuerdo a la época del año en la cual son colectadas las hojas, se determinó la composición química de los compuestos volátiles de ejemplares juveniles de laurel y se evaluó la actividad antidepresiva por vía inhalatoria en ratones.

Para ello, se realizaron tres colectas de hojas y plántulas de *L. glaucescens* en diferentes meses del año, se obtuvieron los aceites esenciales de cada una de las colectas y se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, la cuantificación de los compuestos se realizó con curvas de calibración de estándares. También, se realizó un análisis de los compuestos volátiles con la técnica de head-space en plántulas. Por último, para

evaluar la actividad antidepresiva del aceite esencial por vía inhalatoria se utilizó el modelo de nado forzado en ratón.

Los resultados de los análisis revelaron que existe una variación en la cantidad de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *L. glaucescens*, preparado a partir del material colectado en diferentes fechas, por lo que podemos afirmar que los diferentes estadios del desarrollo que presenta la planta en su ciclo reproductivo afecta en la composición del aceite (Amin *et al.*, 2007; D' antuono *et al.*, 2000). También se determinó que la composición de los volátiles en individuos juveniles es similar a la de los aceites esenciales obtenidos a partir de hojas secas de individuos adultos, pero en abundancias muy diferentes. Por otra parte, se determinó que la administración del aceite esencial administrado por vía inhalatoria tiene efecto antidepresivo en ratones.

II. Introducción

2.1 Principios de los ritmos biológicos

La variación del metabolismo de los organismos vivos en diferentes intervalos de tiempo siempre ha sido de gran interés por los investigadores, dichos estudios comenzaron por la incertidumbre de conocer la influencia que tenía el medio ambiente en las variaciones internas de los organismos en el tiempo (Mercado y Díaz, 2011). Pittendrigh y otros investigadores de manera independiente en el siglo XX, demostraron con varios experimentos que los animales tienen un “dispositivo interno” de mantenimiento del tiempo (Gupta *et al.*, 2013). Años después, se acuña el término formal de ritmo biológico; definiéndose como las variaciones que existen en las actividades biológicas de los organismos en función del tiempo, negando absolutamente que las funciones de todos los organismos se expresan de manera constante (Maurya *et al.*, 2012).

Desde el surgimiento de esta idea, grandes personalidades de la historia realizaron sus primeros experimentos en organismos vegetales, observando cambios en las plantas en relación al día y la noche (Gupta *et al.*, 2013). Dichas variaciones pueden ser causadas por componentes 1) bióticos: insectos, hongos, plantas y principalmente por los 2) abióticos: cantidad de agua, temperatura, luz, pH, suelo, humedad. Otros factores como el dimorfismo sexual, estacionalidad del año (primavera, verano, otoño, invierno) y variación en el tiempo de colecta ha sugerido que modifican la cantidad y el tipo de compuestos producidos en la mayoría de las especies vegetales (Kobayashi, 2004). La mayoría de los estudios de variaciones cronológicas están hechos en animales, en plantas hay pocas y en particular en plantas de importancia nacional no hay ninguna.

Si bien la cantidad y el tipo de volátiles que genera una planta es de suma importancia en su existencia, desarrollo y reproducción, por otra parte, puede influir en sus propiedades medicinales por lo que este trabajo se seleccionó como objeto de estudio a *Litsea glaucescens*, planta aromática de importancia medicinal y económica.

2.2 México y las plantas medicinales

En México, más del 90% de la población usa plantas medicinales para el tratamiento empírico de diversas enfermedades, esto se debe a que son recursos de fácil acceso y económicos comparados con los medicamentos de patente e incluso los genéricos. Por otra parte, cierta parte de la población utiliza las plantas ya que piensan que al ser de origen natural no tienen efectos secundarios.

De las plantas medicinales que utiliza la población en México, aproximadamente el 78% se emplea para la atención de enfermedades respiratorias, digestivas, problemas dérmicos y ginecológicos (Taddei-Bringas *et al.*, 1999).

Muchas especies utilizadas por los nativos desde épocas prehispánicas, se han seleccionado e incorporado gradualmente a la medicina tradicional actual (Becerra, 1993), ampliando la riqueza histórica y cultural. Sin embargo, la aprobación y el uso de los remedios tradicionales aún no son admitidos ni reconocidos por la mayoría de los médicos e Instituciones de Salud (Taddei-Bringas *et al.*, 1999), por lo que la importancia de las plantas medicinales no sólo radica en su riqueza como parte de la cultura (Santillán, 2012), sino también en el conocimiento científico que se genera a partir de su estudio, para documentar sus aplicaciones, estudios farmacológicos y asegurar su eficacia y seguridad (Andrade-Cetto, 2009).

2.3 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas de compuestos orgánicos volátiles, están constituidos de 20-60 componentes químicos en la mayoría de los casos. En las plantas dichos compuestos son sintetizados como metabolitos secundarios, principalmente se almacenan en células secretoras, células epidérmicas o tricomas glandulares y pueden encontrarse en todos los órganos de la planta (Bakkali *et al.*, 2008).

Los aceites, se caracterizan por la presencia de dos o tres compuestos de concentración mayor (20-70%) en comparación a otros componentes presentes en trazas, generalmente los compuestos químicos mayoritarios son los que

determinan las propiedades biológicas de los aceites esenciales. Algunas de las propiedades biológicas de los aceites esenciales (insecticida, antibacteriana, antifúngica y antiviral), están sustentadas en observaciones de los mecanismos de defensa que ha desarrollado la planta respecto a su entorno natural (Bakkali *et al.*, 2008), pero existe una amplia variedad de propiedades medicinales asignadas a distintos aceites esenciales, por ejemplo: actividad anti-inflamatoria (Miguel, 2010), antioxidante (Sari *et al.*, 2006), sedante, anticonvulsiva (Tortoriello y Romero, 1992; Freire *et al.*, 2006), antiespasmódica (Bakkali *et al.*, 2008) y antidepresiva (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012) entre otras.

2.4 Depresión y tratamiento

El aumento exponencial de la población mundial, la crisis económica de algunos países y el estilo de vida en la actualidad, ha llevado a problemas de salud como la depresión y la ansiedad (Sarris *et al.*, 2011). La depresión es un trastorno mental común en todo el mundo, se estima que 300 millones de personas de todas las edades la padecen, pero más mujeres se ven afectadas por la depresión que los hombres. Existen casos donde la depresión puede convertirse en una condición de salud grave y en el peor de los casos llevar al suicidio (OMS, 2017).

Existen medicamentos antidepresivos eficaces como citalopram, gepirona, fluoxetina e imipramina (Rodríguez-Landa y Contreras, 2000), pero más de la mitad de los afectados en todo el mundo no recibe estos medicamentos, esto se debe principalmente a la falta de personal capacitado para diagnosticar esta enfermedad y a la falta de recursos económicos para sostener el tratamiento médico (OMS, 2017). Alternativamente, existen diferentes especies de plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de la depresión que han resultado ser efectivas (Sarris *et al.*, 2011; Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012), por ejemplo; *Passiflora suberosa* (pasiflora), *Valeriana officinalis* (valeriana), *Tagetes lucida* (pericón), *Salvia elegans* (mirto), *Artemisia absinthium* (ajenjo) (Rajput *et al.*, 2011) e *Hypericum perforatum* (Hierba de San Juan) (Pennington *et al.*, 2009) por mencionar algunas.

De éstas, un caso muy conocido es el uso de la raíz de valeriana (*Valeriana officinalis*), la cual es ampliamente utilizada desde la época prehispánica como sedante y ansiolítico (Savage *et al.*, 2017). Hoy en día, se sigue utilizando y se ha comprobado su efectividad con experimentos *in vivo* en ratas macho, donde el extracto etanólico tiene efecto ansiolítico y antidepresivo, determinado mediante el modelo de laberinto en cruz elevada (EPM) y nado forzado (FST) respectivamente (Hattesoehl *et al.*, 2008). Otro estudio, realizado por Rahimi *et al.*, (2009), destaca en ensayos clínicos una diferencia significativa entre *Hypericum perforatum* y los antidepresivos convencionales.

En la actualidad existen diversos fitomedicamentos disponibles en México, la Cofepris en el 2014, autorizó la venta de medicamentos de origen vegetal de dos nuevos extractos; *Hypericum perforatum* y *Valeriana officinalis* para tratar la depresión moderada, siendo los nombres comerciales Remotiv® (250 y 500 mg) e Hyperikan® (300mg) así como de Ivel® (500mg) y Taflavix® (100mg) respectivamente, siendo su valor comercial menor a \$ 400 MXN.

Actualmente nuestro grupo de investigación está estudiando a *Litsea glaucescens*, mejor conocida como laurel, especie mexicana con actividad antidepresiva (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012).

III. Antecedentes

3.1 Género *Litsea*

Litsea es un género de árboles o arbustos a veces dioicos o monoicos, (Lorea-Hernández y Jiménez-Pérez, 2010) consta de 400 especies de las cuales ocho se encuentran distribuidas en el continente americano y siete presentes en México (Fig.1) (Jiménez-Pérez *et al.*, 2011). Actualmente, pertenece a la familia Lauraceae y al orden de las Laurales (Lorea-Hernández y Jiménez-Pérez, 2010; APG III, 2009).

Las especies de *Litsea* se encuentran distribuidas a lo largo del país en climas cálidos, semi-secos, secos y templados asociándose a la flora de los bosques tropicales perennifolios, bosques de encino, bosques mixtos de pino-

encino, abarcando altitudes de 10 a los 2900 msnm (Argueta-Villamar *et al.*, 1994).

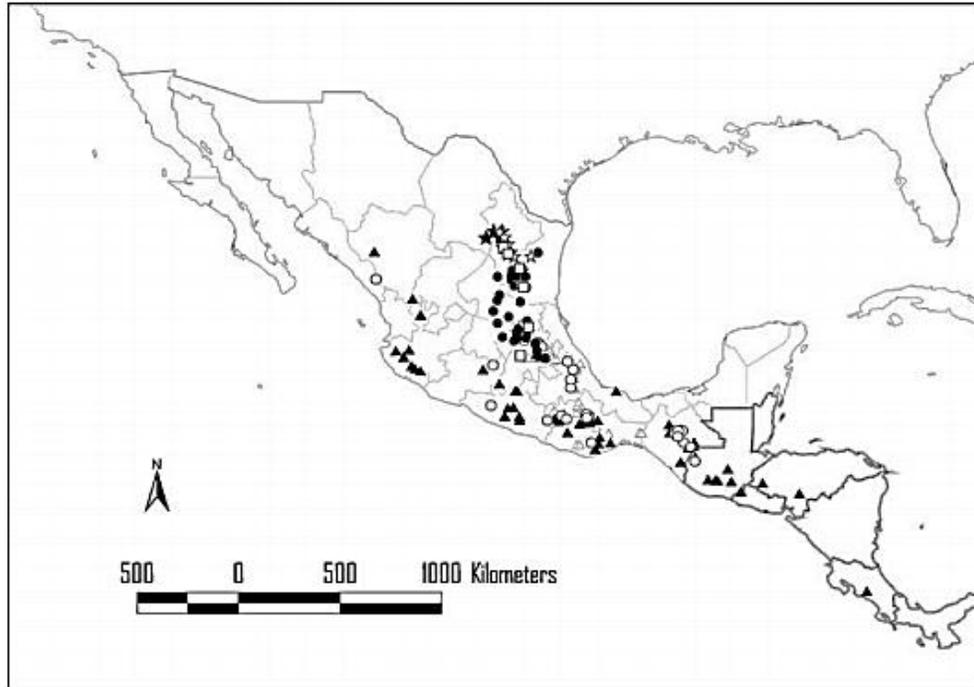


Figura 1. Distribución de *Litsea spp.* en México y América Central; Δ : *L. glaucescens*; \blacktriangle : *L. guatemalensis*; \square : *L. muelleri*; \circ : *L. neesiana*; \star : *L. parvifolia*; \star : *L. pringlei*; \bullet : *L. schaffneri* (Tomado de Jiménez- Pérez *et al.*, 2011).

Litsea glaucescens, es un arbusto dioico que alcanza un tamaño de 0.5 a 10 metros de altura (Van der Werff y Lorea, 1997). Las hojas son generalmente lanceoladas, glabras, caracterizadas por tener un color brillante en el haz y gris en el envés; inflorescencias (masculinas y femeninas) axilares, umbeladas, solitarias o agrupadas a lo largo de las ramas; las flores presentan regularmente coloración amarilla y se encuentran agrupadas entre 3 a 6 flores. Sus frutos son globosos, pequeños y de color negro cuando están maduros, aproximadamente de 1cm de diámetro (Fig. 2) (Argueta-Villamar *et al.*, 1994). Florecen de marzo a abril (Dávila-Figueroa *et al.*, 2011).

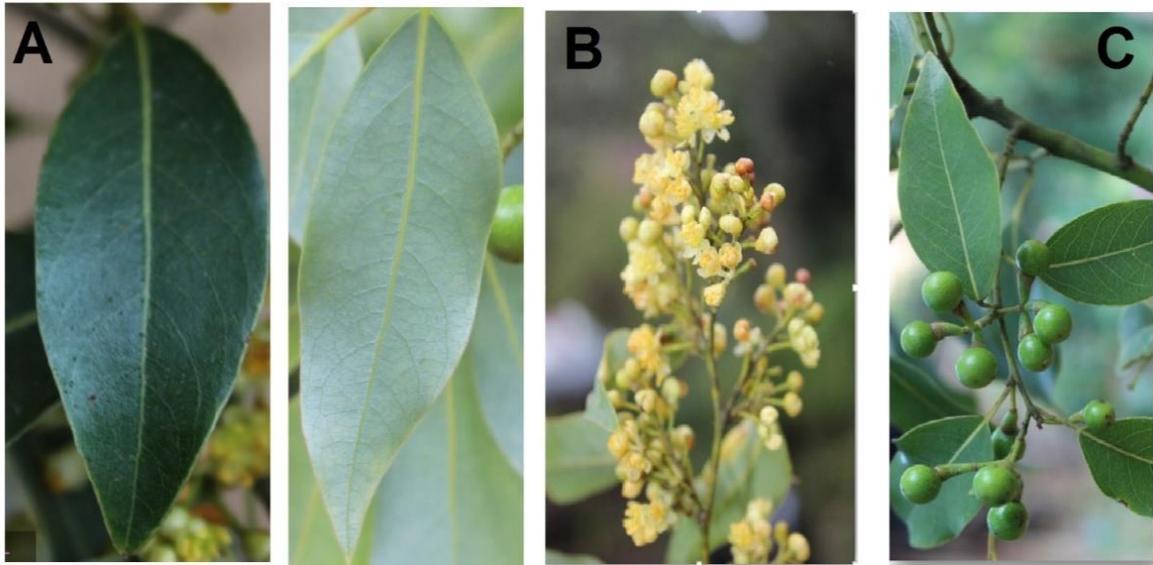


Figura 2. Fotografías de *Litsea glaucescens* A) Detalle del haz y el envés B) Coloración amarillenta y detalles de flores del ejemplar femenino C) Frutos globosos e inmaduros (Tomadas en las diferentes colectas 2017, J. Karina Díaz Cantón).

3.2 Usos medicinales de *Litsea glaucescens*(Kunt)

La primera fuente bibliográfica en la que se menciona el uso de *L. glaucescens* data del siglo XVI; donde Francisco Hernández en su publicación “La Historia de las Plantas de la Nueva España” describió una especie nombraba por los nativos como "ecapatli", el autor menciona: “es una especie de laurel parecido al europeo pero con las hojas más pequeñas” (Valdés y Flores, 1985). También menciona que los nativos utilizaban el ecapatli para tratar la epilepsia y la parálisis, con la decocción y baños con los vapores de las hojas (Hernández, 1959), cabe resaltar que dichos padecimientos están relacionados con el sistema nervioso (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012).

En el libro Florilegio Medicinal el cual es una combinación entre la medicina tradicional de Europa y la del Nuevo Mundo escrito por Juan de Esteyneffer en 1712, se menciona el uso del laurel para la cura de enfermedades frías, dolores de cabeza y parálisis con el vapor de una decocción de las hojas, así como una serie de recetas para el tratamiento de tumores, eliminar la ascitis y los gusanos intestinales donde el principal ingrediente son hojas de laurel, que recientemente

ha sido interpretado como *Litsea glaucescens* (Esteyneffer, 1978; Jiménez-Pérez *et al.*, 2011).

3.3 Usos medicinales, culturales y gastronómicos en la actualidad

De acuerdo con el Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana (Argueta-Villamar *et al.*, 1994), se ha reportado su uso para el tratamiento de trastornos estomacales, tales como diarrea, calambres e indigestión. También se aplica en problemas ginecológicos, como dolores post-parto, facilitar el nacimiento, tratar la dismenorrea, la esterilidad, para curar dolor, infecciones, fiebres y reumatismo. El modo de preparación es en infusión o en maceración con etanol de las hojas de laurel. El modo de aplicación es baños en los vapores, incluyendo el temazcal e inhalación de vapor de agua y fregado del extracto etanólico.

La etnia Mazahua de Atacomulco prepara una decocción de hojas de laurel junto con otras plantas medicinales para tratar enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central por ejemplo nerviosismo, susto o tristeza (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012).

Además de su uso en la medicina tradicional, *Litsea glaucescens* se emplea en cuestiones gastronómicas para la elaboración de pastas, sopas, caldos y pescados usando las hojas como condimento. Otro uso popular para las hojas del laurel es en rituales religiosos, principalmente en la elaboración de ornamentos para la fiesta católica del Domingo de Ramos (Armenta *et al.*, 2011).

A pesar de los varios usos que se le pueden dar al laurel, la alta explotación de esta especie se debe al uso excesivo de las hojas en la gastronomía mexicana, por lo que la SEMARNAT ha catalogado a *L. glaucescens* en peligro de extinción en la NOM- 059-ECOL-2010 (SEMARNAT, 2010).

3.4 Estudios químicos y biológicos de *L. glaucescens* (Kunt)

Las especies americanas de laurel son poco conocidas y estudiadas (Jiménez-Pérez *et al.*, 2011), sin embargo, se sabe por estudios relacionados que el género

Litsea contiene flavonoides, terpenos, alcaloides (Fig. 3), esteroides, lignanos y ácidos grasos (Kong *et al.*, 2015).

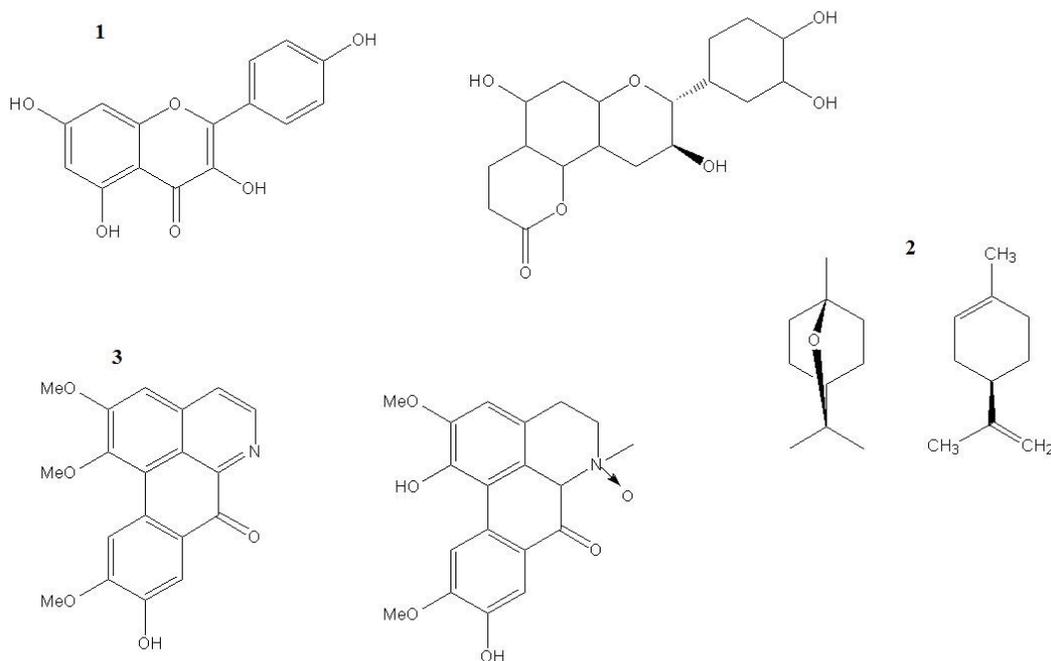


Figura 3. Estructuras químicas de compuestos típicos aislados de plantas del género *Litsea*: 1) Flavonoides: kaempferol e isofillocoumarina 2) Terpenos (Monoterpenos): eucaliptol y limoneno 3) Alcaloides: aterolina e isoboldina (Tomado y modificado de Kong *et al.*, 2015).

En el 2011, Jiménez-Pérez y colaboradores determinaron la composición química del aceite esencial foliar de las siete especies de laurel distribuidas en México (*L. glaucescens*, *L. guatemalensis*, *L. muelleri*, *L. neesiana*; *L. parvifolia*, *L. pringlei* y *L. schaffneri*), identificando un total de 206 compuestos en los aceites esenciales, pero solo 46 compuestos rebasaban el 1% de abundancia relativa.

Los compuestos mayoritarios reportados para *L. glaucescens* en este mismo estudio son: eucaliptol, linalol, terpinen-4-ol y α -terpineol, seguido de α -pineno, β -pineno y o-cimeno (Fig. 4). Por otra parte, los autores determinaron que la especie mayormente usada como condimento es *L. glaucescens*, e infieren que esto se debe a su alto contenido de eucaliptol (cuadro 1), ya que este compuesto le confiere características organolépticas más agradables respecto a las otras seis especies.

Cuadro 1. Composición química (% v/v) del aceite esencial foliar de las siete especies mexicanas de laurel (Tomado y modificado de Jiménez-Pérez *et al.*, 2011).

Compuesto	<i>L. neesiana</i>	<i>L. glaucescens</i>	<i>L. guatemalensis</i>	<i>L. schaffneri</i>	<i>L. parvifolia</i>	<i>L. pringlei</i>	<i>L. muelleri</i>
Eucaliptol	1.92	36.29	1.38	23.74	0.76	21.19	19.46
Linalol	14.58	5.01	21.95	11.42	8.88	14.36	1.46
α -pineno	10.11	9.52	10.76	11.93	0.63	2.74	12.50
β -pineno	4.06	7.33	4.61	6.04	0.52	1.29	8.56
o-cimeno	0.40	4.98	0.40	7.22	0.31	3.81	5.94
terpinen-4-ol	0.3	10.55	0.28	6.82	0.22	2.97	5.48
α -terpineol	0.39	0.60	1.63	6.43	0.25	3.12	1.39
β -cariofileno	0.26	0.82	1.86	0.10	1.50	1.33	1.69
Oxido de cariofileno	0.20	0.17	2.43	0.11	3.65	9.94	0.38

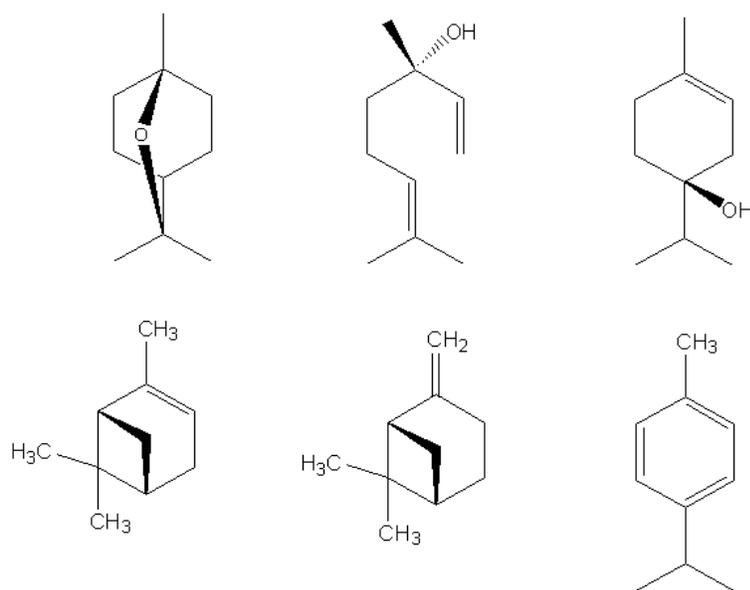


Figura 4. Compuestos identificados mayoritarios del aceite esencial de *L. glaucescens*, de izquierda a derecha: eucaliptol, linalol, Terpenin-4-ol, α -pineno, β -pineno y o-cimeno).

Guzmán-Gutiérrez y colaboradores (2012) determinaron la actividad antidepresiva del aceite esencial de *L. glaucescens* por vía intraperitoneal, dicha actividad la evaluaron con un modelo conductual *in vivo* en ratón llamado de nado forzado (FST). En este modelo propuesto por Porsolt *et al.*, 1977, describe que la conducta de los animales obligados a nadar en un espacio reducido y sin escape es la inmovilidad y que los antidepresivos disminuían esta conducta. En el estudio de Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012, observaron disminución en el tiempo de inmovilidad con respecto al vehículo, esto quiere decir que el aceite esencial tiene potencial efecto antidepresivo y que la disminución de esta inmovilidad no tiene relación con un efecto en la actividad motora espontánea del ratón evaluada en el modelo de campo abierto.

IV. Hipótesis

Con base en los antecedentes mencionados de esta especie aromática mexicana se plantea:

- El aceite esencial de *L. glaucescens* preparado a partir de ejemplares colectados de ambos sexos en diferentes épocas del año tendrán diferencias en su composición.
- Si existen variaciones en la producción de metabolitos secundarios en *L. glaucescens* durante un día, entonces habrá diferencias en la composición de los compuestos volátiles liberados por la especie en la mañana y noche.
- El aceite esencial de *L. glaucescens* presentará actividad antidepresiva administrado por vía inhalatoria.
- El aceite esencial tendrá actividad anti-micobacteriana.

V. Objetivos generales

- Determinar la composición química del aceite esencial de *L. glaucescens* obtenido a partir de material colectado en diferentes épocas del año y de ejemplares de ambos sexos.
- Determinar la variación en la composición de los compuestos volátiles de *L. glaucescens*.
- Evaluar el efecto antidepresivo del aceite esencial de *L. glaucescens*.
- Determinar la actividad anti-micobacteriana de *L. glaucescens*.

5.1 Objetivos particulares

- Determinar la composición química del aceite esencial de hojas *L. glaucescens* preparado a partir de diferentes colectas durante el año.
- Determinar las variaciones en la composición química del aceite esencial de *L. glaucescens* obtenido de ejemplares masculino y femenino.
- Determinar la variación en la composición química de los compuestos volátiles liberados por *L. glaucescens* en la mañana y en la tarde-noche de individuos juveniles.

- Evaluar la actividad antidepresiva del aceite esencial administrado por vía inhalatoria y comparar la actividad del aceite administrado por vía i.p.
- Evaluar la actividad anti-micobacteriana del aceite esencial *in vitro*.

VI. Material y métodos

6.1 Colecta y extracción del aceite esencial

El material vegetal de *Litsea glaucescens* fue colectado en tres diferentes meses del año (febrero, mayo y julio), en el mismo horario (14:00 a 15:00 horas) de los mismos ejemplares masculino y femenino, en la localidad de Huitzila en el estado de Veracruz a 18° 42' 42.6" latitud Norte y 97° 10' 22.4" latitud Oeste; a una altura de 2222 msnm.

El material colectado se dejó secar durante 15 días a temperatura ambiente sobre papel periódico posteriormente se almacenó en bolsas de plástico.

La identificación taxonómica del ejemplar la realizó el M. en C. Ramiro Cruz Durán, en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM, y dos ejemplares fueron depositados en el mismo sitio con los números de Voucher: 161832 y 161833 (Fig. 5).

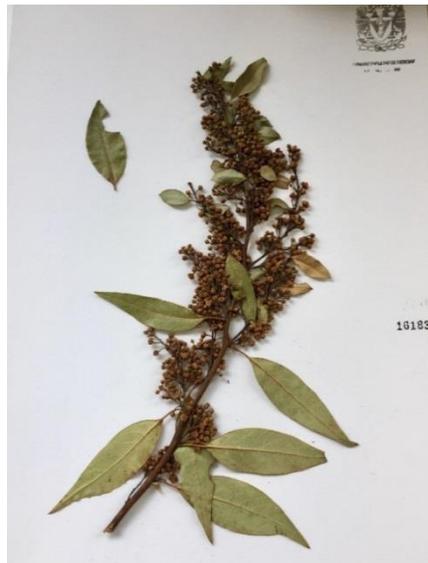


Figura 5. Ejemplar de *L. glaucescens* (Kunt) (161833). Depositado en la colección del Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Las hojas de cada colecta fueron trozadas y pesadas junto con frutos y/o flores, y se colocaron en el equipo de destilación por arrastre de vapor. La destilación de cada muestra duró 2 horas. El aceite esencial obtenido se almacenó en un vial ambar de 4 mL a 4°C hasta su uso. Se calculó el rendimiento de cada uno de los aceites esenciales empleando la siguiente ecuación:

(1)

$$\frac{100 * \textit{gramos de aceite esencial obtenido}}{\textit{gramos de material vegetal hidrodestilado}} = \% \text{ de rendimiento}$$

6.2 Análisis químico del aceite esencial

Los aceites esenciales fueron analizados en el Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y la Conservación del Patrimonio Cultural del Instituto de Química (LANCIC-IQ), con la asesoría de la M. en C. Mayra León Santiago. Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent technologies 7890B GC acoplado a un espectrómetro de masas Agilent technologies 5977 MSD. Las muestras de aceite esencial se prepararon en un rango de concentraciones de 1 µg/mL hasta 4 µg/mL, dependiendo de la señal emitida en el equipo. El aceite esencial de cada una de las colectas, así como los estándares se disolvieron en cloroformo. El volumen de inyección fue de 1µL, se utilizó una columna HP-5ms, fenilo al 5%, dimetilpolisiloxano al 95%, 30 m x 250 µm x 0.25 µm, utilizando las siguientes condiciones: gas acarreador, helio (He); flujo, 1mL/ min, velocidad media 36.262 cm/sec. Se inició el análisis con una temperatura de 40°C durante 1 minuto pasado ese tiempo comenzó una rampa de calentamiento de 15°C/minuto hasta alcanzar los 300°C y esta temperatura se mantuvo 2 minutos. Los constituyentes del aceite esencial fueron caracterizados por comparación de su tiempo de retención (tr) y sus espectros de masas con los de estándares inyectados en el mismo equipo y utilizando el mismo método. En algunos casos, en ausencia de un estándar, la identificación se realizó por índice de similitud de los espectros de

masas con los reportados en la librería del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST 2014).

6.3 Cuantificación de los compuestos en el aceite esencial

Mediante el programa Qualitative Analysis B.0700 se obtuvieron las áreas bajo la curva de los compuestos del aceite esencial (Fig. 6), para determinar la abundancia relativa (%) de dichos compuestos se empleó la siguiente ecuación:

(2)

$$\frac{\text{Área del compuesto de interés}}{\text{Suma de las áreas totales obtenidas}} \times 100$$

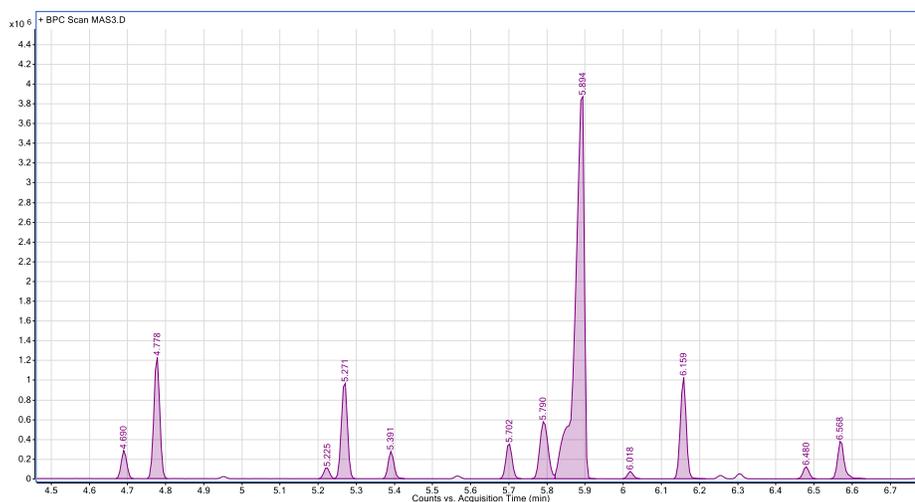


Figura 6. Cromatograma del aceite esencial de *L. glaucescens*.

Posteriormente, para determinar la cantidad exacta de los compuestos presentes en el aceite esencial se realizaron curvas de calibración por triplicado con estándares certificados de eucaliptol, linalol, D-limoneno, α -pineno, β -pineno y α -terpineol. De los cromatogramas resultantes se obtuvieron las áreas bajo la curva, se calculó el promedio, desviación estándar, error estándar y se graficaron los datos, obteniendo para cada curva de calibración una ecuación lineal y el coeficiente de correlación de Pearson (R^2) (anexo 1).

6.4 Análisis químico de los compuestos volátiles

Los compuestos volátiles se analizaron, tanto en las hojas como en los individuos juveniles con la técnica de Head-Space Micro-extracción en Fase Sólida (HS-SPME). Se utilizó una fibra Supelco de divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (50/30 μm DVB/CAR/PDMS) de 2 cm, la cual después de ser expuesta a los compuestos volátiles se expulsó en el puerto de inyección durante dos minutos en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas.

En el caso del análisis de los volátiles de las plántulas, se contaba con cuatro ejemplares. Cada planta se colocaba en un contenedor de vidrio cilíndrico de 50 cm de alto x 25 cm de diámetro. La fibra se introdujo en la parte alta del contenedor, se selló la base y la tapa de la parte superior con parafilm (Fig. 7). Para la toma de muestra, con base en experimentos preliminares, se establecieron las siguientes condiciones: tiempo de equilibrio 15 min (sin exponer la fibra) y tiempo de adsorción 3h (con la fibra expuesta) y sin ventilación.

Para el análisis de volátiles en hojas, se trozaron 200 mg de material y se introdujeron en un vial de vidrio de 40 mL, se añadieron 5 mL agua destilada a 25°C y 75 mg de cloruro de sodio. La tapa del vial estaba acondicionada con septa de silicona (Fig. 7). La mezcla se mantuvo en agitación y temperatura constante, para la adsorción de volátiles se siguió el protocolo establecido por Álvarez-Ospina *et al.*, 2013.

Tanto en el análisis de los volátiles de plántulas como en el de los volátiles de las hojas, se acondicionó en el inyector del sistema CG, de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.



Figura 7. Imágenes del proceso de extracción mediante HS-SPME. 1) Sistema acondicionado para la extracción de volátiles de individuos juveniles (derecha) 2) Sistema para la extracción de volátiles de hojas recién cortadas (izquierda). (Fotografías tomadas por J. Karina Díaz Cantón, 2017).

6.5 Evaluación de la actividad antidepressiva

Todos los experimentos fueron realizados con ratones CD1 machos (25-30g) adquiridos de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. Los ratones permanecieron antes y durante el experimento en un cuarto de alojamiento de animales del Instituto de Química con temperatura constante ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) en un ciclo 12 h luz/ 12 h oscuridad. Los animales fueron separados en grupos de 10 y tuvieron libre acceso a alimento y agua.

Todos los procedimientos que involucran el uso de animales de experimentación se llevaron a cabo conforme a lo descrito en la Norma Oficial Mexicana: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), acorde con que las reglas internacionales sobre el uso de animales de experimentación. Además, el protocolo experimental fue aprobado por el comité de ética del Instituto de Química (CICUAL-IQ-002-17).

Para evaluar el efecto antidepressivo del aceite esencial por vía intraperitoneal, se utilizaron 30 ratones divididos en tres grupos: control solución salina 0.9% (Tween 80 0.1%), control positivo imipramina (IMI) 22.6 mg/kg y aceite

esencial (AE) 100 mg/kg. El volumen de administración fue 0.1 mL/10 g de peso de ratón. Los ratones del grupo AE, se administraron con el aceite del ejemplar masculino de *L. glaucescens*, el cual se suspendió en solución salina con Tween 80 (0.1%). Todos los grupos se administraron tres veces: 24, 18 y 1 h antes de las pruebas.

La dosis del aceite esencial, el volumen de administración y el número de administraciones está basada en estudios anteriores (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012). Sin embargo, la dosis de administración del grupo IMI, control positivo, fue modificada, y se eligió la administración de 3 veces la dosis de 22.6 mg/kg (las gráficas que justifican este cambio se encuentran en el anexo 2).

Para la evaluación la antidepresiva por vía inhalatoria del aceite esencial de *L. glaucescens*, se utilizaron 12 ratones divididos en dos grupos: control aceite puro de maíz y aceite esencial. Con base en un experimento preliminar (Anexo 3) se determinó que el volumen de aceite esencial en la cámara de inhalación sería de 20 µL. Para el sistema de inhalación se utilizó una caja transparente con tapa (26 x 22 x 20 cm); en la parte inferior central se colocó una caja Petri de vidrio con el volumen de aceite correspondiente (Fig. 8). Antes de introducir a los ratones, la caja se saturó con los volátiles del aceite durante 5 minutos, posteriormente se colocaron los ratones dentro de la caja en grupos de 2 ratones exponiéndolos al olor durante 30 minutos, una vez terminado el tiempo de exposición, se retiraron los ratones e inmediatamente después se sometían a la prueba de campo abierto y posteriormente a la prueba de nado forzado.

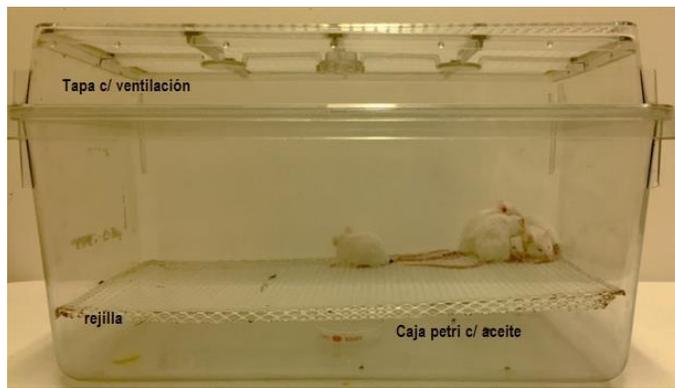


Figura 8. Caja de administración del aceite esencial de *L. glaucescens* por vía inhalatoria.

6.6 Pruebas conductuales

6.6.1 Nado forzado

El modelo utilizado está basado en lo establecido por Porsolt *et al.*, (1977), con algunas modificaciones. Consiste en administrar a los ratones con un fármaco antidepresivo o una sustancia de prueba y 1 h posterior a la última administración, se colocan durante 6 minutos en un contenedor cilíndrico con agua (24 ± 1 °C) hasta 15 cm de altura. Del contenedor no hay escape y después de un periodo inicial de movimientos vigorosos el ratón adopta una conducta de inmovilidad, haciendo los movimientos mínimos necesarios para mantenerse a flote, dicha conducta se le relacionada con la depresión (desesperanza) y se ha demostrado que los fármacos antidepresivos utilizados en la clínica son capaces de disminuir ese tiempo (Fig. 9). Todas las pruebas fueron filmadas y analizadas después del experimento. Se registró el tiempo de inmovilidad (segundos) de cada ratón durante los últimos cuatro minutos de la prueba y se consideran inmóviles cuando solo hacen los movimientos mínimos necesarios para mantenerse a flote.



Figura 9. Ratones sometidos a la prueba de nado forzado de izquierda a derecha; a) animal manteniéndose a flote; b) animal realizando intentos por escapar del contenedor (Fotografías tomadas de las grabaciones en tiempo real de esta prueba; J. Karina Díaz Cantón, 2016).

6.6.2 Campo abierto

El modelo de campo abierto se utilizó para evaluar el efecto del aceite esencial sobre la actividad motora espontánea. Esta prueba la realiza cada ratón justo antes de ser introducido en el cilindro de agua. Se coloca al ratón en un espacio delimitado y dividido en cuadrantes durante dos minutos. El objetivo de este experimento es validar la prueba de nado forzado, determinando que efectivamente la reducción en la inmovilidad de los ratones se debe a un efecto “antidepresivo” y no a un aumento de la actividad motora espontánea (Gould *et al.*, 2009). El parámetro que se cuantificó fue el número de cuadrados recorridos (con las cuatro patas en un cuadrado) en un período de 2 minutos (Fig. 10).

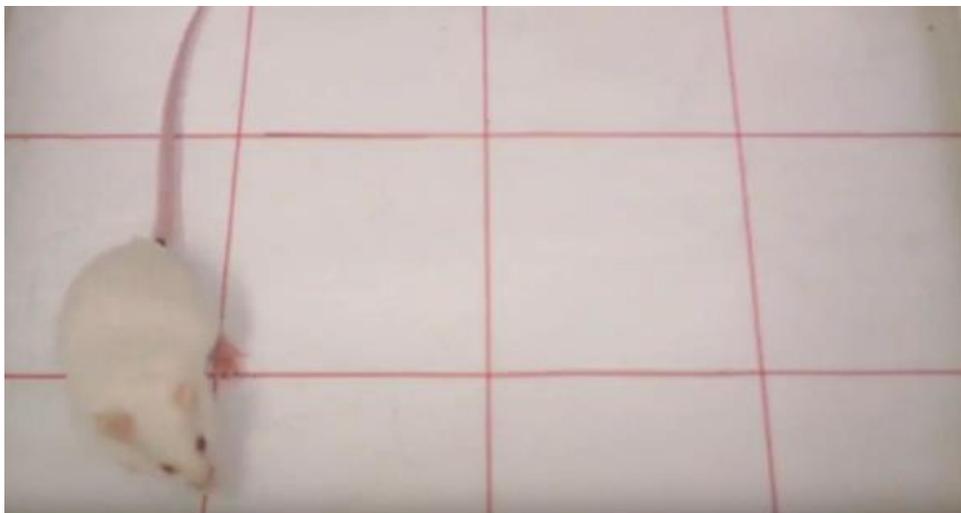


Figura 10. Ratón sometido a la prueba de campo abierto (Fotografías tomadas de las grabaciones en tiempo real de esta prueba; J. Karina Díaz Cantón, 2016).

6.6.3 Evaluación de la actividad anti-micobacteriana

Este ensayo se realizó bajo la dirección de la Dra. Mayra Silva Miranda, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en el laboratorio de Bioseguridad BSL-3. Se utilizó *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 (American Type Culture Collection). Se tomaron 500 μ L de inóculo bacteriano y se agregaron a 50 mL de medio 7H9 Middlebrook enriquecido con ADC (albumina-dextrosa-catalasa) y tyloxapol al 0.02%, 5 días antes del ensayo, y se mantuvieron en agitación a 200 rpm a 37°C. Una vez pasado el tiempo de incubación se midió la densidad óptica (D.O) a 600 nm del cultivo y se ajustó a una D.O de 0.4 con un nefelómetro. De esta suspensión se realizó una dilución 1 a 25 en medio de cultivo (más o menos D.O final 0.025).

En una placa de 96 pozos de poliestireno transparente con fondo plano se agregaron 100 μ L de medio de cultivo 7H9 (glicerol, 10% ADC) y tyloxapol, 100 μ L del inóculo de *M. tuberculosis*, dejando la periferia de la placa con 200 μ l de agua o PBS para evitar la pérdida de muestra por evaporación. Se adiciona una curva de rifampicina (fármaco de referencia) desde una concentración 16 μ g/mL hasta 0.00095 μ g/mL y se colocaron 6 controles extra en 6 pozos distintos, rifampicina sin bacteria, DMSO sin bacteria, DMSO con bacteria, medio sin bacteria, medio con bacteria y medio sin bacteria con sustancia de prueba.

Por último, se agregaron los compuestos evaluados a concentraciones finales desde 500 y 250 $\mu\text{g/mL}$ (aceite esencial). Se incubaron durante 6 días a 37°C en cámara húmeda; una vez finalizada la incubación se agregaron 30 μl de Resazurina al 0.01% en agua (filtrada por 0.22 μm), se dejó incubar por 48 horas y se procedió a leer las placas.

Las lecturas se hicieron visuales y la MIC se definió como la mínima concentración de aceite esencial a la cual ocurrió un cambio de color de azul a rosa. Una MIC mayor a 300 $\mu\text{g/mL}$ se considera no activo.

El resumen del método desarrollado para la evaluación de los aceites esenciales de *L. glaucescens* se muestra en la figura 11.

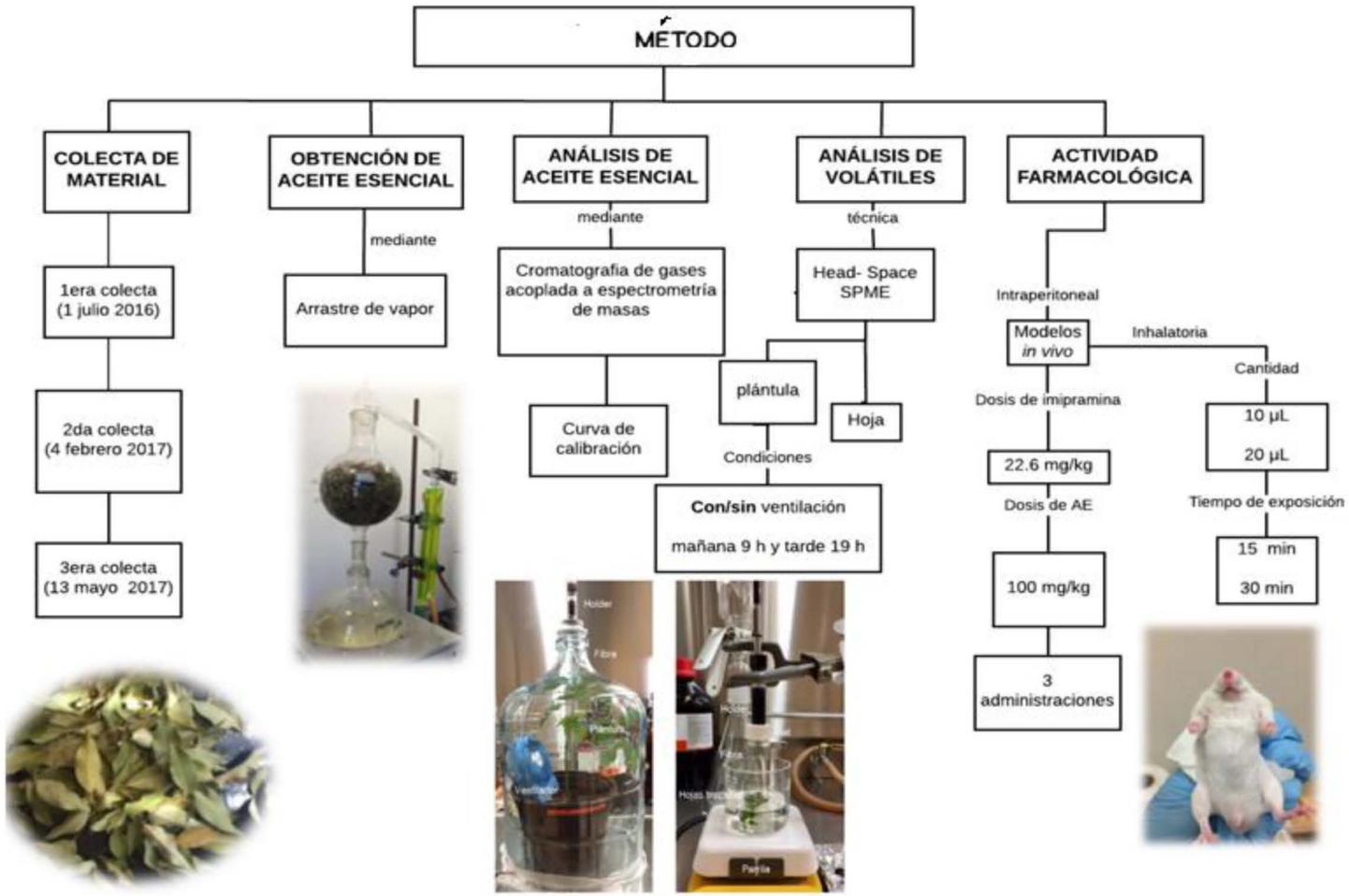


Figura 11. Resumen del método de la evaluación de la composición química del aceite esencial, los compuestos volátiles de *L. glaucescens* y la evaluación de la actividad anti-depresiva.

VII. Resultados y discusión

7.1 Rendimiento de los aceites esenciales

En el cuadro 2, se indican los rendimientos obtenidos de aceite en cada colecta. El mayor rendimiento se obtuvo en la colecta de julio del 2016 en el ejemplar femenino.

Cuadro 2. Rendimientos obtenidos de los aceites esenciales de tres colectas diferentes.

Mes y año de colecta	Julio de 2016		Febrero de 2017		Mayo de 2017	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Rendimiento %	0.78	0.74	0.59	0.53	0.66	0.68

El primer estudio sobre la composición química de *L. glaucescens* lo realizó Jiménez-Pérez *et al.* (2011), los autores reportan que el rendimiento de aceite esencial colectado también en Huitzila, en 2008 fue de 1.15%. En el 2012, nuevamente se reportó el rendimiento para una nueva colecta, en la misma localidad, del 0.85% (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012). Los rendimientos reportados en este trabajo son menores, esto se debe a que el aceite esencial de la colecta de Jiménez-Pérez se obtuvo por hidrodestilación con un equipo tipo Clevenger y en este caso y en el estudio del 2012 los aceites se obtuvieron por arrastre de vapor. También, las diferencias se deben a los meses de colecta de cada uno de los estudios (noviembre, abril, febrero, mayo y julio respectivamente).

Ahora bien, el rendimiento del aceite esencial para especies de la misma familia, es similar, por ejemplo, para *Laurus nobilis* (laurel europeo, Campania, sur de Italia) se reporta con 0.57% y para *Cinnamon verum* (canela) se reporta 1% de rendimiento, en ambos casos se obtuvo el aceite por hidrodestilación (Caputo *et al.*, 2017; Sohrabi *et al.*, 2017). En algunos casos se ha observado que es más recomendable la extracción por arrastre de vapor, ya que en el caso de hidrodestilación al estar en contacto el material vegetal con el agua puede generarse mayor degradación de los principios del aceite (Périno-Issartier *et al.*,

2013). Para especies de otras familias como es el caso de *Hypericum webbia*, se reportan valores entre 0.8 y 1.6% por hidrodestilación (Marčetić *et al.*, 2016). Esta reportado que el rendimiento de aceite esencial depende de la planta, de la época y lugar de colecta, y que varía en promedio entre el 0.5 y el 2% de rendimiento, cuando se obtiene por la técnica de hidrodestilación o arrastre de vapor (D'antuono *et al.*, 2000; Caputo *et al.*, 2017; Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012; Jiménez-Pérez *et al.*, 2011). Los rendimientos obtenidos en este estudio para *Litsea glaucescens* concuerdan con los reportados con anterioridad por nuestro grupo de investigación (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2012). Además se observa que el rendimiento se mantiene dentro del intervalo reportado en la literatura para los aceites esenciales en general (Amin *et al.*, 2007; D'antuono *et al.*, 2000; Msaada *et al.*, 2012). La variabilidad en el rendimiento que observamos en el cuadro 2, también debe de estar influenciada por los cambios fenológicos que presenta la planta a lo largo de su ciclo reproductivo, por consiguiente a la temporada en la cual haya sido colectada (Amin *et al.*, 2007).

7.2 Composición química de los aceites esenciales

Se identificaron entre 29 y 35 compuestos totales presentes en los aceites esenciales. Sin embargo, no todos los compuestos rebasan el 1% de abundancia relativa, por esta razón solo se comparó la presencia de ocho compuestos mayoritarios en las muestras, de los cuales la mayoría rebasan el 1% a excepción del D-limoneno y α -terpineol (Cuadro 3). Estos ocho compuestos están en un rango entre el 69 y el 76 % del total de la composición del aceite y entre ellos están dos de los compuestos que han sido identificados como responsables de la actividad antidepresiva, el linalol y el β -pineno.

Cuadro 3. Composición química en abundancias relativas (%) de los aceites esenciales de *L. glaucescens* en diferentes colectas

Tr (min)	Compuesto	Ejemplar femenino			Ejemplar masculino		
		AE2	AE3	AE1	AE2	AE3	AE1
		febrero	mayo	julio	febrero	mayo	julio
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
4.898	α - pineno	9.67	10.43	8.24	7.18	11.75	10.96
5.406	β -pineno	7.46	8.98	7.92	6.77	9.68	9.05
5.885	o-cimeno	11.94	2.72	17.40	7.63	7.91	6.85
5.972	D-limoneno	PT	PT	PT	7.12	PT	6.40
6.179	Eucaliptol	35.08	36.87	33.10	31.30	34.31	31.06
6.676	Linalol	4.38	7.40	4.37	3.51	4.05	2.39
7.530	Terpinen-4-ol	7.60	9.43	4.79	5.58	6.29	6.34
7.655	α -terpineol	0.16	0.40	0.27	0.17	0.30	0.28

Tr: Tiempo de retención

PT: Presente en trazas

AE: Aceite esencial, primera, segunda y tercera colecta.

La composición química del aceite de *L. glaucescens* se encuentra conformada en su mayoría por compuestos de tipo terpenos, específicamente monoterpenos, y el mayoritario es uno oxigenado, el eucaliptol (cuadro 3 y 4), estos resultados concuerdan con los ya obtenidos en nuestro grupo de investigación. En el cuadro 3 se pueden apreciar las abundancias relativas (%) de los componentes de los aceites esenciales. Los porcentajes se determinaron a partir de los cromatogramas que se obtuvieron del análisis de cromatografía de gases

acoplada a espectrometría de masas. Es importante mencionar que el cálculo de la abundancia relativa (%) es un parámetro bastante común para determinar la composición química de algún extracto o aceite esencial y que, en su mayoría, los artículos reportan los análisis con estos valores. En este estudio se complementó la información obtenida con la cuantificación de algunos compuestos mayoritarios del aceite esencial (cuadro 4), mediante curvas de calibración (Anexo 1).

Los resultados de la cuantificación se muestran en el cuadro 4. Estos datos muestran resultados preliminares, de las diferencias en la composición química del aceite esencial colectado en diferentes meses y en dos individuos de distinto sexo (ejemplar femenino y masculino). Se puede observar que en mayo, cuando hay calor y aun no hay lluvias constantes, en general la cantidad de los componentes mayoritarios es más alta en ambos ejemplares, masculinos y femeninos, y menor en el mes de julio cuando ya es temporada de lluvias. El eucaliptol se mantuvo como el compuesto mayoritario en todas las colectas y en ambos sexos, con valores en un rango de 315.96 $\mu\text{g/mL}$ a 1219.05 $\mu\text{g/mL}$.

De los tres primeros compuestos mayoritarios (eucaliptol, α -pineno y β -pineno) se presentó una cantidad más alta en el ejemplar masculino. Del linalol hay una cantidad muy similar en los tres meses de colecta, y para ambos sexos la mayor cantidad se presentó en mayo. En el caso de D-limoneno, éste se encuentra en trazas en los ejemplares femeninos en las tres diferentes colectas, por lo que este compuesto podría ser un marcador de la diferencia entre ejemplares masculinos y femeninos.

Esto es muy relevante ya que en estudios preclínicos y clínicos, sería importante considerar si los aceites esenciales provienen de ejemplares masculinos o femeninos.

Cuadro 4. Concentración en $\mu\text{g/mL}$ de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Litsea glaucescens*.

Tr (min)	Compuesto	Ejemplar femenino			Ejemplar masculino		
		AE1	AE2	AE3	AE1	AE2	AE3
		febrero	mayo	julio	febrero	mayo	julio
		<i>($\mu\text{g/mL}$)</i>			<i>($\mu\text{g/mL}$)</i>		
4.898	α - pineno	88.64	89.46	32.27	70.07	173.85	88.22
5.406	β -pineno	64.33	71.72	32.94	62.54	127.66	68.17
5.972	D-limoneno	PT	PT	PT	104.57	PT	77.57
6.179	Eucaliptol	761.96	774.88	315.96	737.72	1219.05	601.84
6.676	Linalol	48.54	69.01	28.86	43.48	65.40	30.48
7.655	α -terpineol	19.91	36.24	16.76	21.96	44.31	26.24

Tr: Tiempo de retención

PT: Presente en trazas

AE: Aceite esencial, primera, segunda y tercera colecta.

Como ya se mencionó, el compuesto mayoritario en todas las colectas de *L. glaucescens* es el eucaliptol, en el caso del laurel europeo, *Laurus nobilis*, también su componente mayoritario es el eucaliptol, lo que les confiere propiedades organolépticas similares y lo que llevó a que la especie mexicana fuera llamada laurel también. Por esta razón, *L. glaucescens* ha sido la especie más utilizada a diferencia de las otras especies de *Litsea* presentes en México (Jiménez-Pérez *et al.*, 2011), y si se toma en cuenta que también tiene un amplio uso cultural (ramos), se justifica la amplia disminución en sus poblaciones silvestres.

El linalol, es uno de los compuestos responsables de la actividad antidepresiva de *L. glucescens* y siempre estuvo presente en las diferentes colectas en ambos sexos. Esto es relevante, ya que nos indica que de este principio activo se tiene una producción constante y se puede cosechar en cualquier época del año, ya que el aceite producido a partir de él mantendría estándares de calidad a lo largo del año. Por otra parte el linalol es común en aceites esenciales con actividad antidepresiva y/o ansiolítica, por ejemplo, el aceite esencial de *Lavandula angustifolia* (lavanda) tiene actividad ansiolítica (Linck *et al.*, 2010) y contiene principalmente, acetato de linalilo, linalol, acetato de geranilo y β -cariofileno (López *et al.*, 2017). El aceite esencial de *Pimpinella anisum* (anís) mostró actividad antidepresiva en el modelo de nado forzado en ratón, y el monoterpeno mayoritario del aceite es el linalol (Samojlik *et al.*, 2012).

Aceites esenciales con alto contenido en linalol de las especies *Aniba rosaeodora*, *Aniba parviflora* y *Aeollanthus suaveolens*, utilizadas en la medicina tradicional del Amazonas (Brasil), presentaron actividad antidepresiva en el modelo de nado forzado en ratas (Dos Santos *et al.*, 2018).

7.3 Análisis químico de los compuestos volátiles

La determinación de volátiles no era un método que estuviera desarrollado en el LANCIC, por lo que este trabajo aporta el diseño del equipo de captura de volátiles a partir de ejemplares juveniles. Como parte del desarrollo de la metodología se determinó la composición de los volátiles con y sin ventilación dentro del sistema de captura (Anexo 4). Después de las pruebas preliminares se estableció que la mejor determinación de los volátiles era sin ventilación, por lo que los resultados que a continuación se muestran son utilizando el sistema de captura sin ventilación.

En el cuadro 5 se presentan los compuestos volátiles liberados por los ejemplares juveniles analizados. Se observó que la composición química de los volátiles es similar a la composición del aceite esencial, ya que contienen los mismos compuestos mayoritarios, pero en cantidades diferentes. En los volátiles se observó que el *o*-cimeno es el compuesto mayoritario (30 %) en ambos horarios, a diferencia del aceite esencial, donde el compuesto mayoritario es el eucaliptol.

En el horario de la tarde-noche se liberó mayor cantidad de componentes mayoritarios, después del *o*-cimeno le sigue el D-limoneno (27.31 %), el eucaliptol (16.50%), el α -pineno (11.7 %), el linalol (9.42 %), el β -pineno (5.32%). Para el horario de la mañana le siguen en abundancia el D-limoneno (20 %) α -pineno (18 %), el eucaliptol (15 %), el β -pineno (5.3 %) el linalol (4.3 %) y al final el γ -terpineno (3.5%). De acuerdo con éstos estudios preliminares, hay diferencias en la liberación de los compuestos volátiles de ejemplares juveniles en la mañana (9-12 h) respecto a la tarde-noche (16-19 h).

La liberación de compuestos volátiles y los cambios en su composición química, durante ciertos periodos de tiempo (mañana-tarde) y en distintas temporadas del año, sugieren algunos papeles biológicos para estos volátiles, por ejemplo: la polinización, la protección de los órganos reproductores y la defensa contra herbívoros y patógenos (Azam *et al.*, 2013; Gershenzon *et al.*, 2000; Jabalpurwala *et al.*, 2009).

También se conoce que la fase de desarrollo de una planta tiene impacto en la producción de volátiles en la hoja. En este estudio, la cuantificación de compuestos volátiles se llevó a cabo en ejemplares juveniles, lo cual podría sugerir que los compuestos presentes en este estudio se vean modificados en su fase adulta (Azam *et al.*, 2013).

Cuadro 5. Abundancia relativa de compuestos volátiles en plántulas sin ventilación en dos horarios diferentes.

Tr (min)	Compuesto	Mañana				Tarde-noche			
		E 1 %	E2	E3	E4	E1	E2	E3	E4
4.898	α -pineno	17.41	17.22	18.59	18.83	3.41	12.10	7.10	24.39
5.406	β -pineno	9.08	1.89	2.57	7.75	3.56	7.70	2.00	10.57
5.707	o-cimeno	25.12	36.39	45.64	14.87	44.54	28.17	29.0	10.32
5.972	D-Limoneno	16.47	26.98	20.07	22.68	23.15	17.35	48.57	20.20
6.179	Eucaliptol	24.41	14.54	5.11	19.12	9.55	27.40	11.72	17.35
5.946	γ -terpineno	3.90	2.98	3.43	4.02	4.94	1.87	1.62	3.16
6.676	Linalol	3.60	0	4.58	9.28	10.85	5.42	0	12.13

Tr: Tiempo de retención
E: Individuos juveniles

Por otra parte, también se exploró la técnica de Head-Space como una posibilidad para evaluar los volátiles de las hojas de *L. glucescens*, sin embargo, una vez que se estableció el sistema de captura de volátiles, se descartó esta técnica. Cabe mencionar que en los experimentos preliminares con hojas, se observó que tienen los mismos compuestos químicos que el aceite esencial y que los volátiles liberados por los individuos juveniles, solamente varía la abundancia relativa de cada uno (Anexo 5).

7.4 Evaluación de la actividad biológica del aceite esencial

7.4.1 Administración del aceite esencial vía intraperitoneal

En primera instancia, en este trabajo se corroboró la actividad antidepresiva del aceite esencial de *L. glaucescens* administrado por vía intraperitoneal a una dosis de 100 mg/kg, preparado de la colecta del mes de julio del 2016, (Fig.12). Además, se determinó que para el nuevo lote de animales la imipramina (control positivo) a una dosis de 22.6 mg/Kg ya producía un efecto antidepresivo significativo. Es posible que el efecto de los fármacos pueda variar de lote a lote de animales de experimentación, es por esto que se evaluó la dosis de imipramina propuesta en el 2012, 30 mg/Kg (Anexo 2). Los resultados de la figura 12, están validados por la prueba de campo abierto, y estos resultados se muestran en el anexo 2.

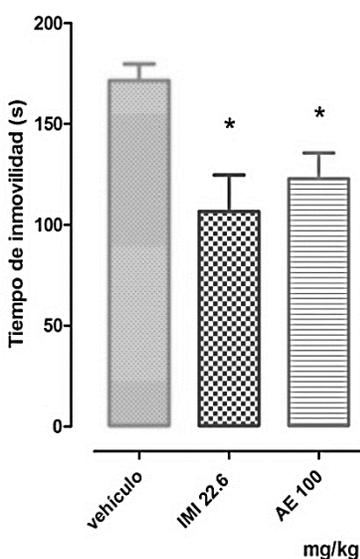


Figura 12. Efecto del aceite esencial de *L. glaucescens* (AE) en ratones sometidos a la prueba de nado forzado. La imipramina (IMI) fue el fármaco control positivo. Cada columna representa la media \pm EEM (n=10). * La diferencia significativa fue determinada por una prueba ANOVA seguida de una prueba de Tukey ($p < 0.05$).

7.4.2 Aceite esencial administrado por vía inhalatoria

Como está descrito en los antecedentes de esta tesis, Francisco Hernández en su publicación “La Historia de las Plantas de la Nueva España” menciona que los nativos utilizaban el ecapatli para tratar la epilepsia y la parálisis, con la decocción y baños con los vapores de las hojas (Hernández, 1959). También Juan de Esteyneffer (1978), menciona que las personas utilizan el vapor de una decocción de hojas para tratar la parálisis, entre otros padecimientos. Si bien nuestro grupo de investigación determinó que el aceite esencial tiene actividad antidepresiva, era importante determinar si este efecto se podía también observar, utilizando el mismo modelo, pero ahora administrando el aceite esencial por vía inhalatoria, que se acerca más a como lo utilizaban las personas.

Para determinar si el aceite esencial de *L. glaucescens* posee efecto antidepresivo administrado vía inhalatoria en ratones, se estableció el volumen de aceite esencial y el tiempo de exposición administrado a los ratones, de acuerdo a experimentos preliminares (Anexo 3).

En la figura 13, se observó la comparación del efecto entre el tiempo de inmovilidad de los ratones administrado por vía inhalatoria con aceite esencial de *L. glaucescens*, y el tiempo de inmovilidad de los administrados por vía intraperitoneal, donde se observó que para ambos grupos se redujo el tiempo con respecto a los grupos control de ambas vías de administración. Asimismo, el grupo administrado con imipramina (i.p.) presentó menor tiempo de inmovilidad respecto a ambos controles (i.p. e inhalatorio). Es importante mencionar que la reducción en el tiempo de inmovilidad de los grupos administrados se encuentra validada con la prueba de campo abierto (Fig.14). En ese modelo se observó que el número de cuadrantes recorridos por los ratones en el grupo control es similar a los cuadrantes recorridos en el grupo aceite esencial, por lo tanto el aceite esencial no afectó la actividad motora general de los ratones y el aumento de la motilidad observada en la prueba de nado forzado se debe a un efecto antidepresivo.

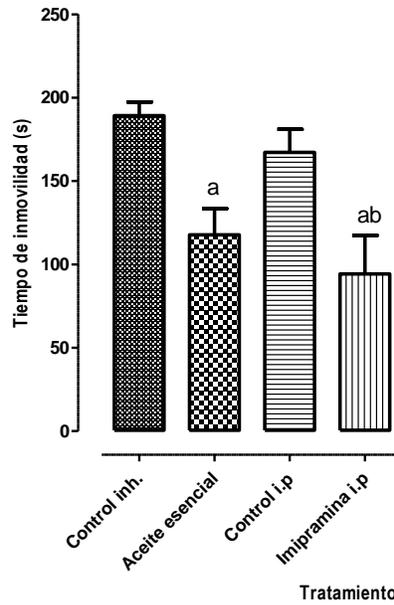


Figura 13. Comparación del efecto del aceite esencial de *L. glaucescens* administrado por vía inhalatoria con los administrados por vía i.p., a ratones (n=6) sometidos a la prueba de nado forzado. Cada barra representa la media \pm EEM. **a)** diferencia significativa con respecto al control administrado por vía inhalatoria (inh). **b)** diferencia significativa con respecto al control administrado por vía intraperitoneal (i.p.). $p < 0.05$, se realizó una prueba ANOVA, seguida de la prueba Tukey.

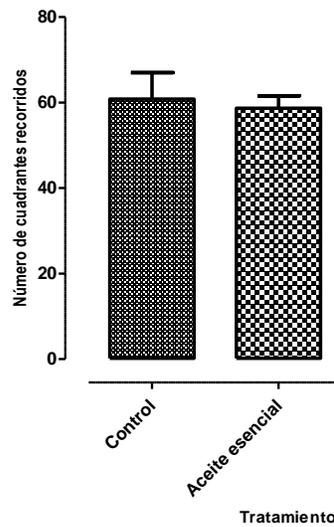


Figura 14. Efecto del aceite esencial de *L. glaucescens* administrado por vía inhalatoria en ratones sometidos a la prueba de campo abierto. Cada columna representa la media \pm EEM (n=6).

Estudios en animales de laboratorio y en humanos han demostrado que la inhalación de aceites esenciales puede producir efectos antidepresivos o ansiolíticos modulando el sistema nervioso central (Park *et al.*, 2015). En el 2015, Park y colaboradores demostraron el efecto antidepresivo de la inhalación del aceite esencial de rizomas de *Asarum heterotropoides* (jengibre) en ratones, mediante la prueba de nado forzado. El aceite esencial de *L. glaucescens*, es más activo ya que los autores observaron actividad antidepresiva a las 3 horas de exposición de los animales, mientras que nosotros reportamos actividad a los 30 minutos de exposición.

También se ha demostrado el efecto de los aceites esenciales en seres humanos, como en el estudio realizado por Kao *et al.*, (2017), donde sometieron a mujeres estudiantes de entre 25 y 55 años a la inhalación de una mezcla de tres aceites esenciales *Lavandula angustifolia*, *Salvia sclarea* y *Origanum majorana* durante 20 minutos, tres veces a la semana por cuatro semanas consecutivas. Como resultado de éste tratamiento se observó una mejora de la calidad del sueño y de la calidad de vida de los pacientes, estos dos parámetros se ven disminuidos en personas con depresión.

7.4.3 Evaluación de la actividad anti-micobacteriana

El aceite esencial no presentó actividad anti-micobacteriana.

VIII. Conclusiones

Se determinó que el aceite esencial producido en diferentes épocas del año tiene una composición variable de los componentes mayoritarios.

Se determinó que hay diferencias en las cantidades de los componentes mayoritarios que producen los ejemplares femenino respecto al masculino (excepto el Linalol).

Se determinó que los ejemplares juveniles de *L. glaucescens* liberan los mismos compuestos volátiles en la mañana (9 a 12 h) y en la tarde –noche (16 a 19 h), pero en cantidades diferentes

El aceite esencial de *L. glaucescens* administrado vía inhalatoria posee efecto antidepresivo de manera similar al aceite esencial administrado por vía intraperitoneal, sin tener efecto en la actividad motora general del ratón, evaluada mediante el modelo de nado forzado y campo abierto respectivamente.

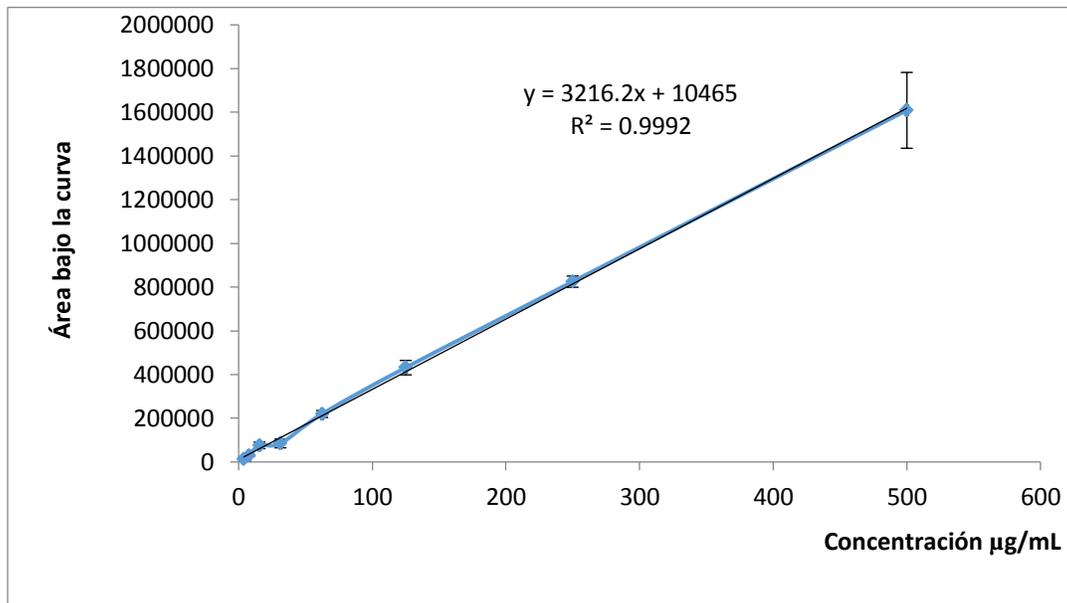
El aceite esencial de *L. glaucescens* no presentó actividad anti-micobacteriana en el ensayo de Resazurina.

IX. Perspectivas

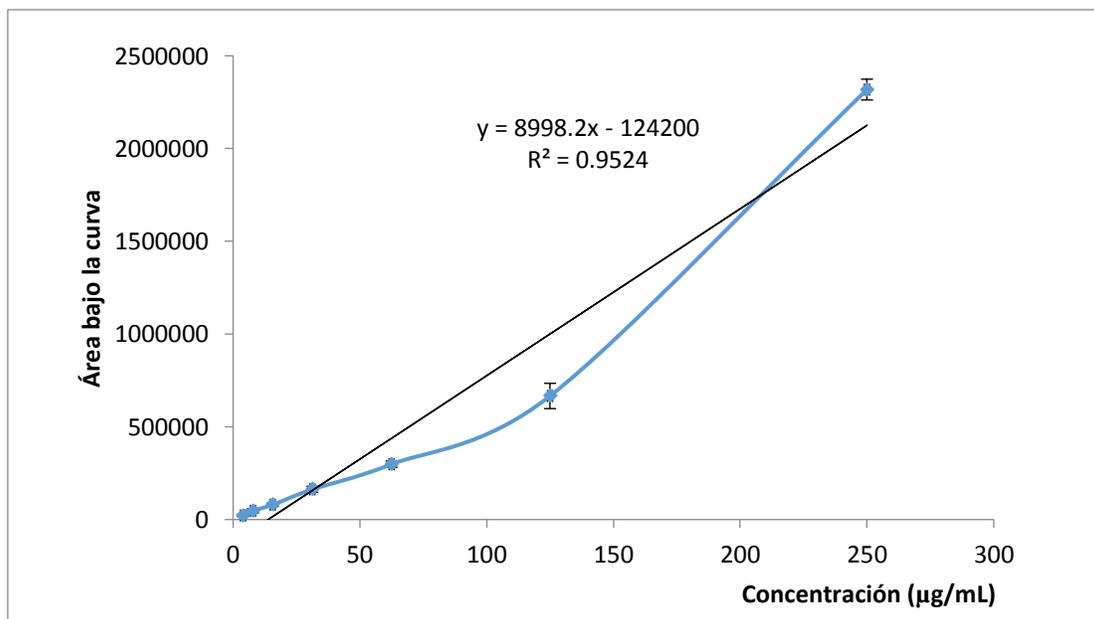
- *Litsea glaucescens* (Kunth), en poblaciones silvestres está catalogada como una especie en peligro de extinción (NORMA-059-SEMARNAT) debido a la colecta inmoderada e ilegal de sus hojas para usos culturales y gastronómicos en nuestro país, es por esta razón que sugiero que se desarrolle un protocolo para la propagación sexual y asexual de esta especie.
- Complementar la información con individuos diferentes y en un número mayor de ejemplares femeninos y masculinos, para determinar diferencias significativas en la variación de la composición química del aceite esencial de *L. glaucescens*, ya que en este estudio a pesar de que se realizaron varias colectas, los aceites esenciales se obtuvieron de un único ejemplar femenino y masculino.
- Esta reportado que el efecto de la infusión de hojas de *L. glaucescens* tiene efecto contra el estrés, por esta razón sugiero que se corrobore esta información y se evalúen los diferentes efectos que podrían tener el extracto acuoso y etanólico.
- Explorar el mecanismo de acción del aceite esencial de *L. glaucescens* administrado por vía inhalatoria.

X. Anexos

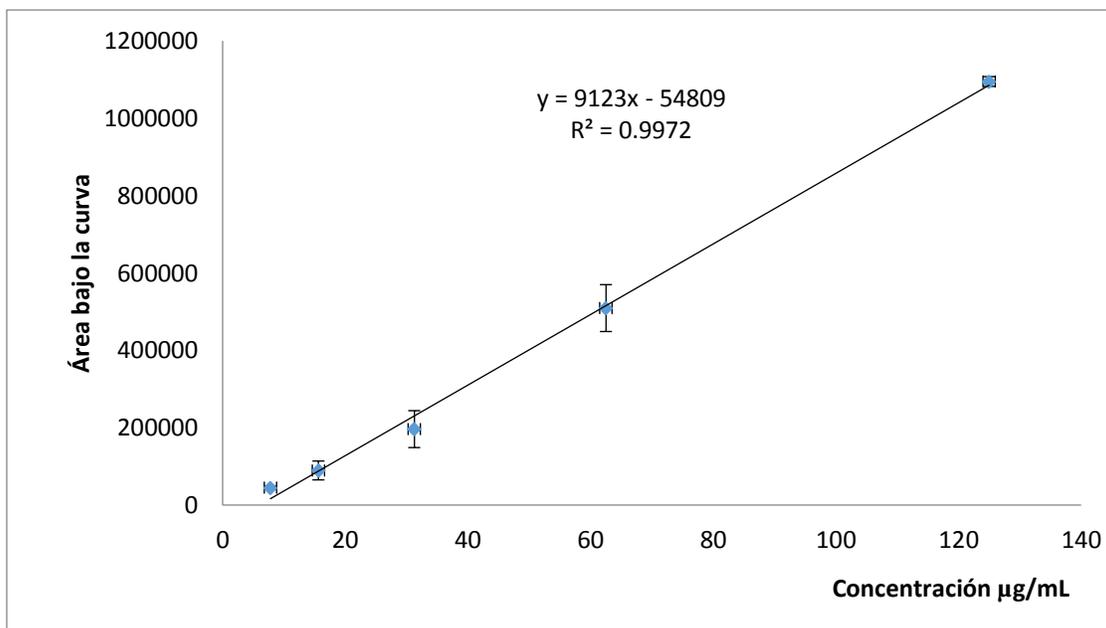
Anexo 1. Curvas de calibración realizadas para cuantificar la concentración en $\mu\text{g/mL}$ de los compuestos presentes en los aceites esenciales de cada colecta.



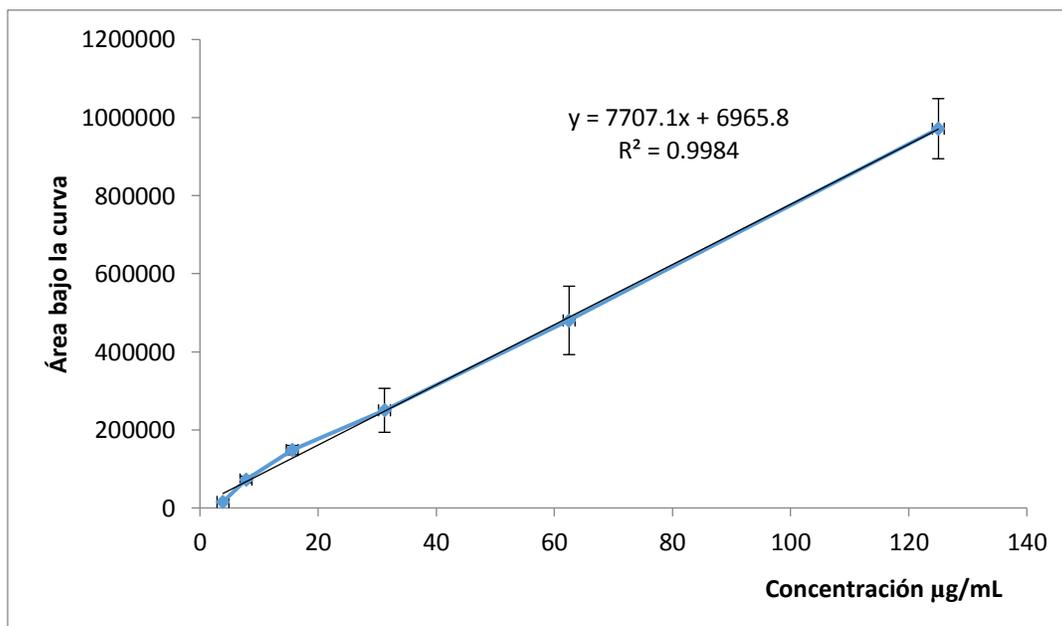
Curva de calibración del compuesto eucaliptol, realizada con ocho puntos ($n=3$).



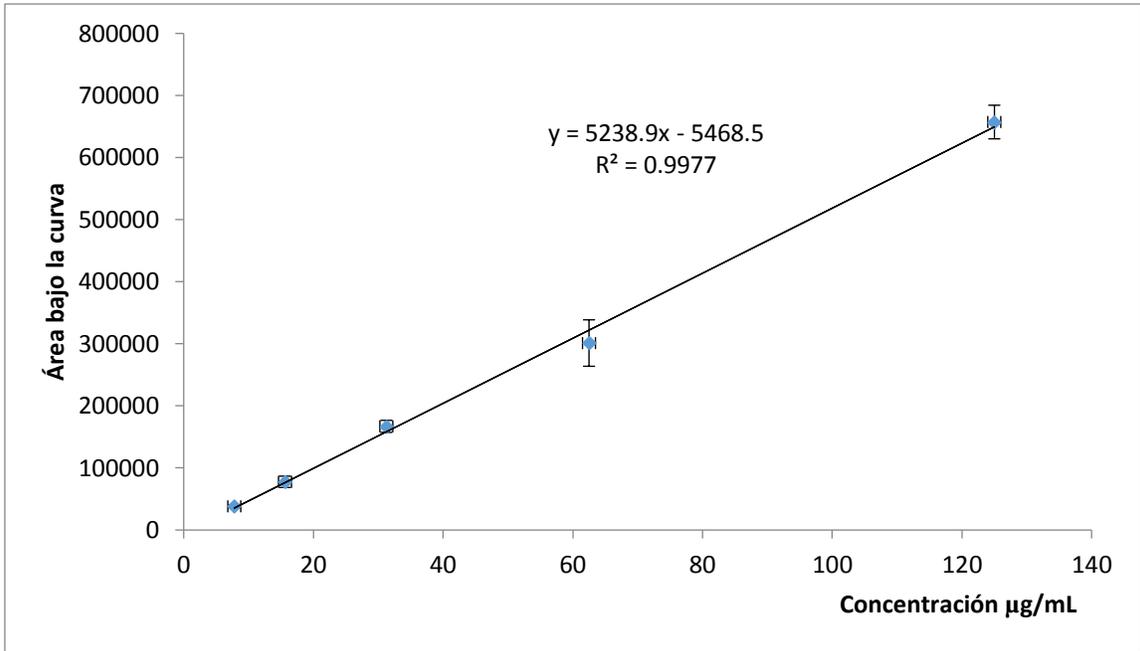
Curva de calibración del compuesto linalol, realizada con siete puntos ($n=3$).



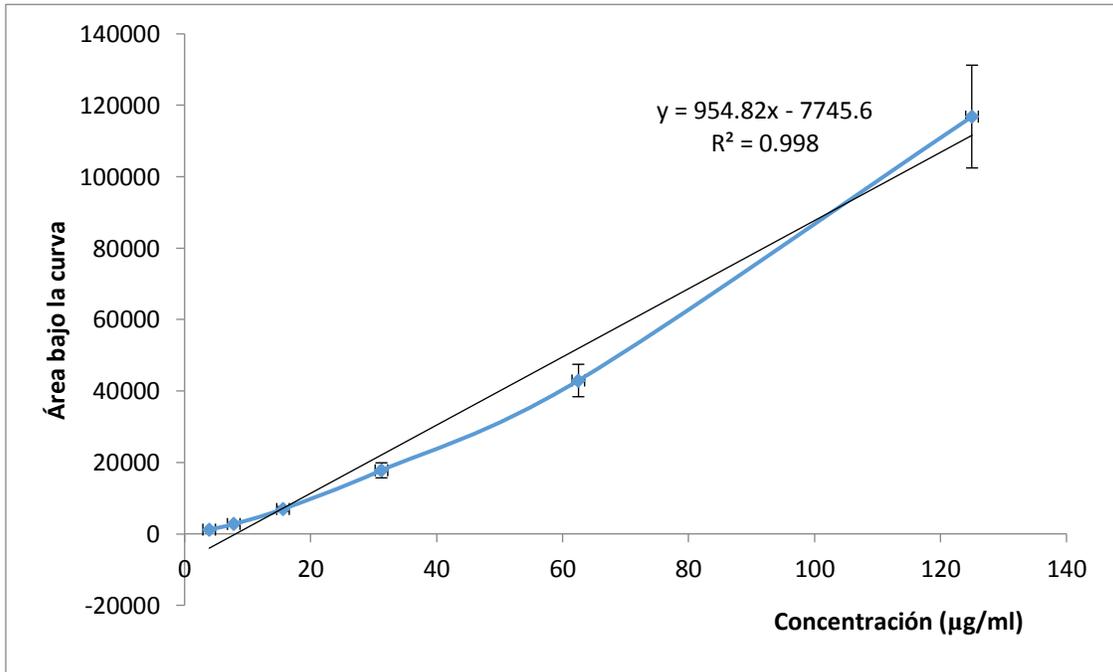
Curva de calibración del compuesto β-pineno, realizada con cinco puntos (n=3).



Curva de calibración del compuesto α-pineno, realizada con seis puntos (n=3).

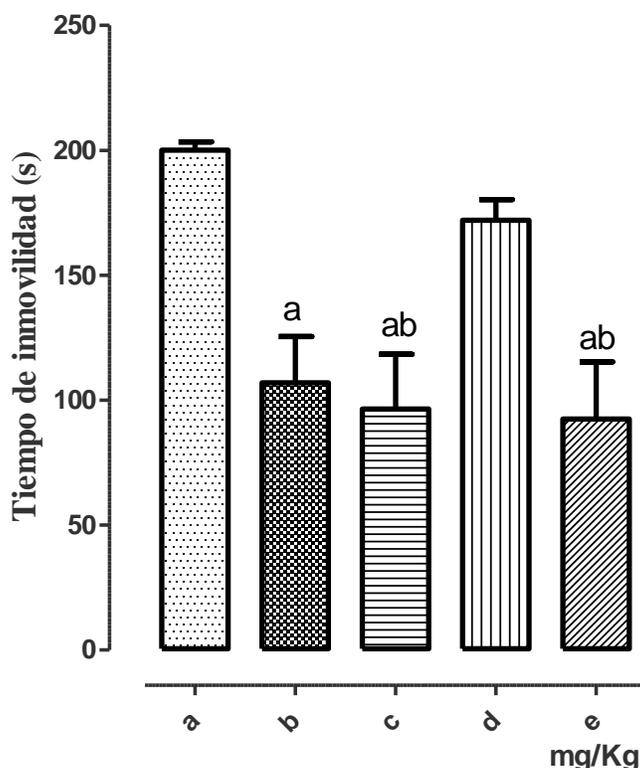


Curva de calibración del compuesto D-limoneno, realizada con cinco puntos (n=3).



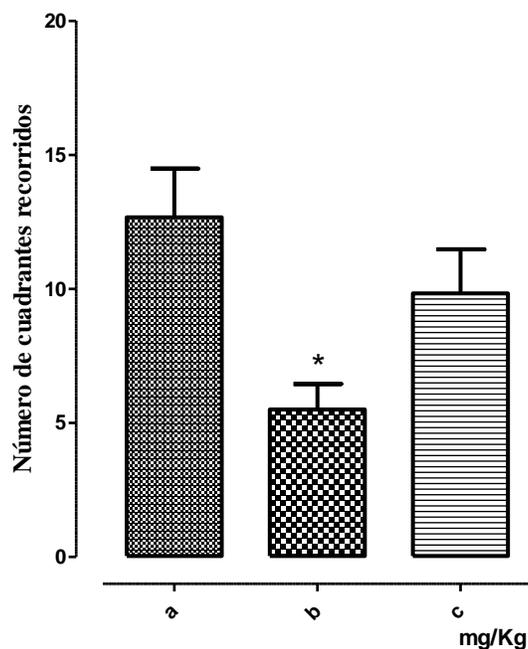
Curva de calibración del compuesto α-terpineol, realizada con seis puntos (n=3).

Anexo 2. Resultados de la modificación al estudio realizado por Guzmán Gutiérrez *et al.*, (2012).



Efecto de la IMI en ratones sometidos a la prueba de nado forzado. Cada columna representa la media \pm EEM (n=6). La diferencia significativa fue determinada por una prueba ANOVA seguida de una prueba de Tukey ($p < 0.05$). a) (tween 80 + solución salina 0.9%, administrado 3 veces), b) imipramina 30 mg/kg administrado 3 veces, c) imipramina 22.6 mg/kg administrado 3 veces, d) tween 80 + solución salina 0.9%, administrado 1 vez y e) imipramina 22.6 mg/kg, administrado 1 vez.

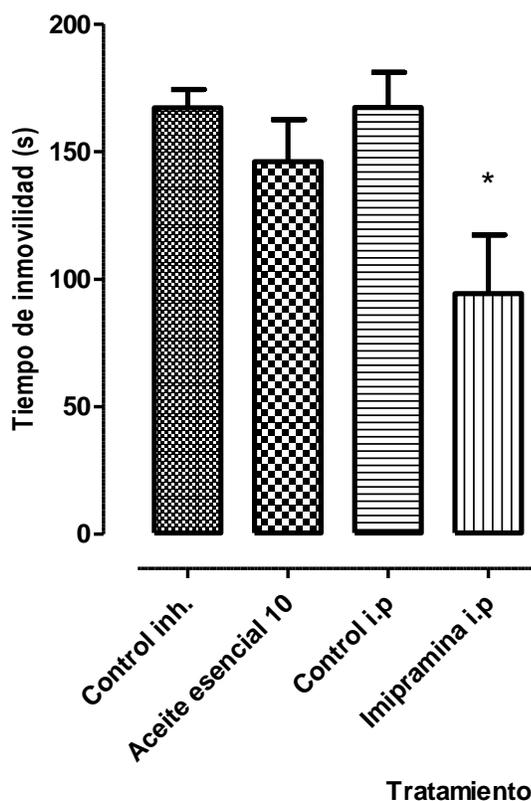
Se observó que la dosis de 30 mg/kg administrada 3 veces redujo significativamente el tiempo de inmovilidad al igual que la dosis de 22.6 mg/kg administrada 1 y 3 veces. Sin embargo, se administró tres veces la dosis de 22.6 mg/kg, porque se observó en el modelo de campo abierto que la dosis de 30 mg/kg afectó la actividad motora general de los ratones. Respecto al número de administraciones en un estudio realizado por Castagné *et al.*, 2010, establecieron que dosis múltiples (2-3) generan efectos más pronunciados y estables.



Efecto de la imipramina (IMI) en ratones sometidos a la prueba de campo abierto. Cada columna representa la media \pm EEM (n=6). * La diferencia significativa fue determinada por una prueba ANOVA seguida de una prueba de Tukey ($p < 0.05$). a) tween 80 + solución salina 0.9%, administrado 3 veces, b) imipramina 30 mg/kg administrado 3 veces, c) imipramina 22.6 mg/kg administrado 3 veces.

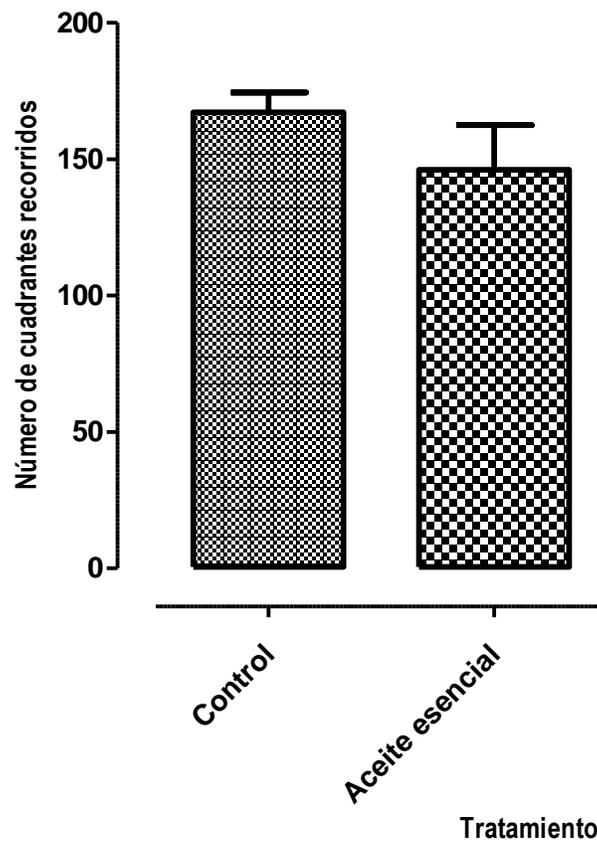
En esta gráfica se observa que la IMI 30 mg/kg administrado tres veces provocó una alteración en la actividad motora general del ratón, debido a que el número de cuadrantes recorridos es reducida significativamente respecto al vehículo. En cuanto a la dosis de IMI 22.6 mg/kg administrada tres veces se observó que el número de cuadrantes es similar al vehículo, lo que significa que efectivamente el aumento en la movilidad de los ratones en la prueba de nado forzado se debe a un efecto “antidepresivo” y no a un aumento de la actividad motora en general.

Anexo 3. Gráficas de la evaluación de la actividad antidepresiva vía inhalatoria del aceite esencial de *L. glaucescens* en ratones sometidos a la prueba de nado forzado y campo abierto. Volumen 10 µL y tiempo de exposición 15 minutos.



Comparación del efecto del aceite esencial de *L. glaucescens* administrado por vía inhalatoria con los administrados por vía i.p., a ratones (n=6) sometidos a la prueba de nado forzado. Cada barra representa la media \pm EEM.

Se observa que el grupo aceite esencial a un volumen de 10 µL disminuyó el tiempo de inmovilidad en los ratones respecto al control, sin embargo esta diferencia no fue significativa. Por otro lado, el grupo IMI i.p disminuyó significativamente el tiempo de inmovilidad en los ratones respecto al control i.p y al control inh. Por lo tanto, en este caso no se observó actividad antidepresiva en el aceite esencial a este volumen y tiempo de exposición.



Efecto del aceite esencial de *L. glaucescensen* ratones sometidos a la prueba de campo abierto. Cada columna representa la media \pm EEM (n=6).

Se observa que el número de cuadrantes recorridos por los ratones en el grupo control es similar a los cuadrantes recorridos en el grupo aceite esencial, por lo tanto el aceite esencial no afectó la actividad motora general de los ratones. La inmovilidad mayormente observada en la prueba de nado forzado en el grupo aceite esencial se debe a la conducta innata de los ratones al ser expuestos a estas condiciones de estrés (Porsolt *et al.*, 1977).

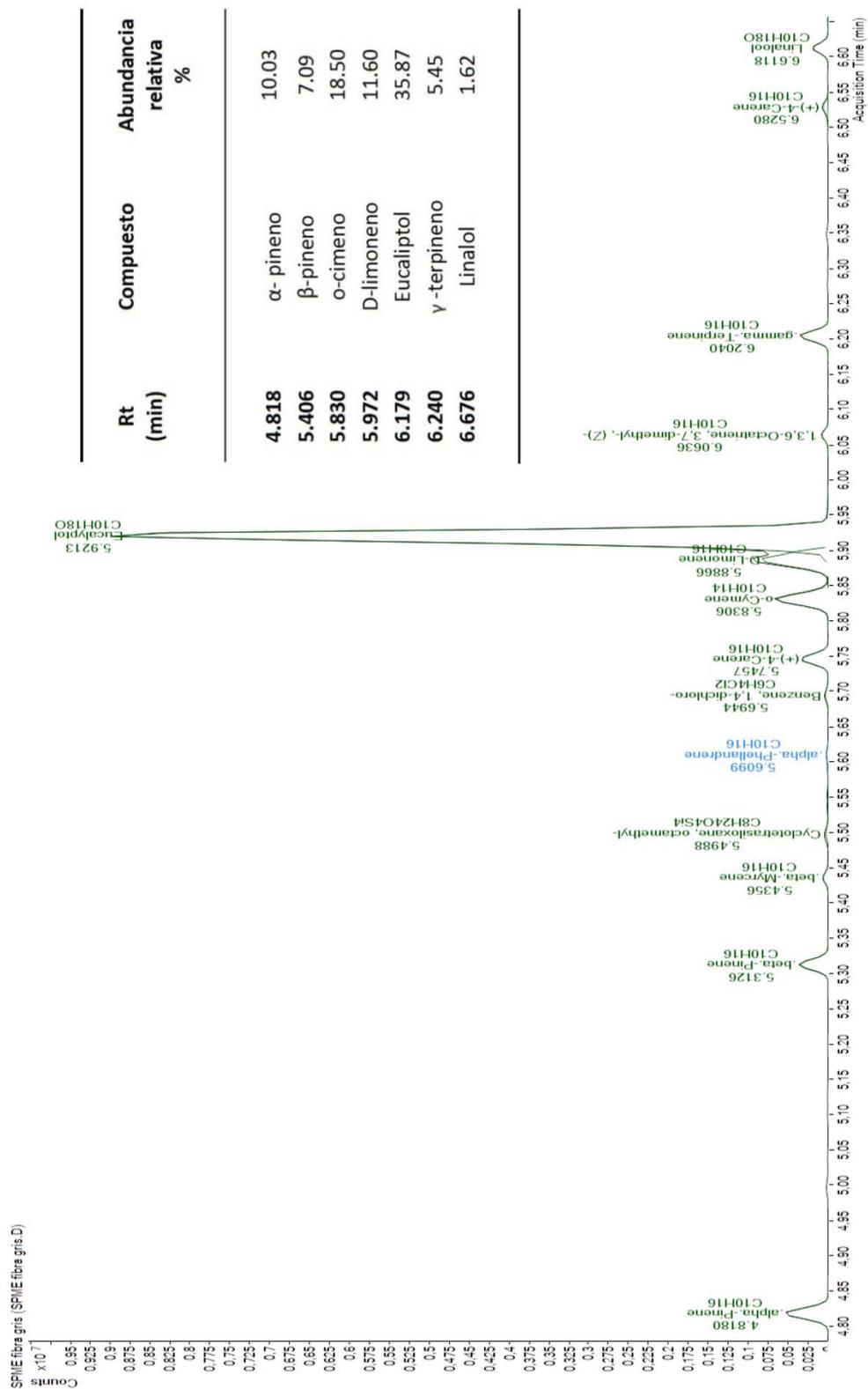
Anexo 4. Abundancia relativa de compuestos volátiles en individuos juveniles con ventilación.

Tr (min)	Compuesto	Mañana			Tarde-noche		
		E 1	E 2	E 3	E 1	E 2	E 3
		%	%	%	%	%	%
4.898	α - pineno	11.88	0	6.87	13.41	0	0.17
5.406	β -pineno	7.82	0	0	0	0	0
5.707	α -cimeno	11.20	0	0	0	0	0
5.972	D-Limoneno	0	4.16	18.79	0	0	8.54
6.179	Eucaliptol	63.13	84.29	62.48	69.78	94.79	87.00
5.946	γ -terpineno	1.60	0	0	0.81	0	0
6.676	Linalol	4.37	11.55	11.86	3.26	5.21	4.28

Tr Tiempo de retención
E: individuos juveniles

En este cuadro se observó que el compuesto mayoritario es el eucaliptol con un valor máximo de 94.79% y de acuerdo con estos datos se libera en su mayoría en la tarde-noche (16 a 19 h), seguido del linalol el cual se libera mayormente en la mañana con un valor de 9.26 %. Respecto a los demás compuestos se observó que no están presentes y esto podría deberse a la saturación de la fibra por el eucaliptol presente en grandes cantidades en el medio.

Anexo 5. Head-Space Micro-extracción en Fase Sólida de hojas de *L. glaucescens*



XI. Bibliografía

- Álvarez-Ospina, H., Rivero Cruz, I., Duarte, G., Bye, R., & Mata, R. (2013). HPLC Determination of the Major Active Flavonoids and GC–MS Analysis of Volatile components of *Dysphania graveolens* (Amaranthaceae). *Phytochemical Analysis*, 24(3), 248-254.
- Amin, G., Sourmaghi, M. S., Jaafari, S., Hadjagae, R., & Yazdinezhad, A. (2007). Influence of phenological stages and method of distillation on Iranian cultivated bay leaves volatile oil. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(17), 2895-2899.
- Andrade-Cetto, A. (2009). Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *Journal of ethnopharmacology*, 122(1), 163-171.
- APG III (2009). This paper was compiled by Birgitta Bremer, Kåre Bremer, Mark W. Chase, Michael F. Fay, James L. Reveal, Douglas E. Soltis, Pamela S. Soltis and Peter F. Stevens, who were equally responsible and listed here in alphabetical order only, with contributions from Arne A. Anderberg, Michael J. Moore, Richard G. Olmstead, Paula J. Rudall, Kenneth J. Sytsma, David C. Tank, Kenneth Wurdack, Jenny Q.-Y. Xiang and Sue Zmarzty (in alphabetical order). Addresses: B. Bremer, The Bergius Foundation at the Royal Swedish Academy of Sciences, PO Box 50017, SE-104 05 Stockholm, Sweden; K. Bremer, Vice Chancellor, Stockholm University, SE-106 91 Stockholm, Sweden; M. W. Chase, M. F. Fay, Jodrell Laboratory, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, TW9 3DS, UK; J. L. Reveal, L.H. Bailey Hortorium, Department of Plant Biology, 412 Mann Building, Cornell University, Ithaca, NY 14853-4301, USA; D. E. Soltis, Department of Biology, University of Florida, Gainesville, Florida 32611–8525, USA; P. S. Soltis, Florida Museum of Natural History, University of Florida, Gainesville, Florida, 32611–7800, USA; and P. F. Stevens, Department of Biology, University of Missouri-St. Louis and Missouri Botanical Garden, PO Box 299, St. Louis, Missouri 63166–0299, USA.
- Argueta-Villamar A., Cano-Asseleih, L.M. y Rodarte, M.E. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México.
- Armenta, M. D. L. P. M., Pacheco, E. V., & Torres, S. M. M. (2011). Aprovechamiento tradicional de una especie protegida (*Litsea glaucescens* kunth) en "Sierra del Laurel", Aguascalientes, México. *Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible*, 7(2), 155-172.
- Azam, M., Jiang, Q., Zhang, B., Xu, C., & Chen, K. (2013). Citrus leaf volatiles as affected by developmental stage and genetic type. *International journal of molecular sciences*, 14(9), 17744-17766.

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Becerra, A. V. 1993. Medicinal flora of México. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 2(1), 55-91.
- Caputo, L., Nazzaro, F., Souza, L. F., Aliberti, L., De Martino, L., Fratianni, F., & De Feo, V. (2017). *Laurus nobilis*: Composition of essential oil and its biological activities. *Molecules*, 22(6), 930.
- Castagné, V., Moser, P., Roux, S., & Porsolt, R. D. (2010). Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Current Protocols in Pharmacology*, 5-8.
- Cofepris (2014). Comisión de Autorización Sanitaria. Dirección Ejecutiva de Autorización de productos y establecimientos. Registros Sanitarios de Medicamentos Herbolarios Expedidos 2014. Consultado 22 de enero de 2018
en:<http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/Herbolarios%202014.pdf>
- D'antuono, L. F., Galletti, G., Bocchini, P. (2000). Variability of Essential Oil Content and Composition of *Origanum vulgare* L. Populations from a North Mediterranean Area (Liguria Region, Northern Italy). *Annals of Botany*, 86, 471-478
- Dávila-Figueroa, C. A., Flores Tena, F. J., Morales Domínguez, F., Clark Tapia, R., & Pérez Molphe Balch, E. (2011). Estatus poblacional y niveles de aprovechamiento del laurel silvestre (*Litsea glaucescens* Kunth) en Aguascalientes. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 2(4), 47-59.
- Dos Santos ÉRQ, Maia CSF, Fontes Junior EA, Melo AS, Pinheiro BG, Maia JGS. (2018). Linalool-rich essential oils from the Amazon display antidepressant-type effect in rodents. *J Ethnopharmacol.* 15;212:43-49.
- Esteyneffer, J. (1978). *Florilegio Medicinal*. M. C. Anzures, ed. México City: Academia Nacional de Medicina.
- Freire, C. M. M., Marques, M. O. M., & Costa, M. (2006). Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. *Journal of ethnopharmacology*, 105(1), 161-166.
- Gershenzon, J., McConkey, M. E., & Croteau, R. B. (2000). Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiology*, 122(1), 205-214.
- Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009). The open field test. Mood and anxiety related phenotypes in mice: Characterization using behavioral tests, 1-20.
- Gupta, R., Gupta, B. M., Khajuria, V., Bhat, N. K., & Gupta, A. (2013). Chronopharmacology: An Overview. *JRationalPharmacother Res drugs*, 2,9.
- Guzmán-Gutiérrez, S. L., Gómez-Cansino, R., García-Zebadúa, J. C., Jiménez-Pérez, N. C., & Reyes-Chilpa, R. (2012). Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: identification of β -pinene and linalool as active principles. *Journal of ethnopharmacology*, 143(2), 673-679.

- Hattesoehl, M., Feistel, B., Sievers, H., Lehnfeld, R., Hegger, M., & Winterhoff, H. (2008). Extracts of *Valeriana officinalis* L. sl show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties. *Phytomedicine*, 15(1), 2-15.
- Hernández, F. (1959). Historia de las plantas de la Nueva España. Obras completas, 2. Universidad Autónoma de México. Imprenta Universitaria, México, D.F
- Jabalpurwala, F. A., Smoot, J. M., & Rouseff, R. L. (2009). A comparison of citrus blossom volatiles. *Phytochemistry*, 70(11-12), 1428-1434.
- Jiménez-Pérez, N. D. C., Lorea-Hernández, F. G., Jankowski, C. K., & Reyes-Chilpa, R. (2011). Essential Oils in Mexican Bays (*Litsea spp.*, Lauraceae): Taxonomic Assortment and Ethnobotanical Implications *Economic botany*, 65 (2), 178-189.
- Kao, Y. H., Huang, Y. C., Chung, U. L., Hsu, W. N., Tang, Y. T., & Liao, Y. H. (2017). Comparisons for Effectiveness of Aromatherapy and Acupressure Massage on Quality of Life in Career Women: A Randomized Controlled Trial. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*.
- Kobayashi, K. (2004). Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. *Weed Biology and Management*, 4(1), 1-7.
- Kong, D. G., Zhao, Y., Li, G. H., Chen, B. J., Wang, X. N., Zhou, H. L., & Shen, T. (2015). The genus *Litsea* in traditional Chinese medicine: An ethnomedical, phytochemical and pharmacological review *Journal of ethnopharmacology*, 164, 256-264.
- Linck, V. M., da Silva, A. L., Figueiro, M., Caramao, E. B., Moreno, P. R. H., and Elisabetsky, E. (2010). Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. *Phytomedicine* 17, 679–683.
- López, V., Nielsen, B., Solas, M., Ramírez, M. J., & Jäger, A. K. (2017). Exploring pharmacological mechanisms of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil on central nervous system targets. *Frontiers in pharmacology*, 8, 280.
- Lorea-Hernández, F.G. & Jiménez-Pérez, N. (2010). Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán: Lauraceae Juss. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología.
- Lozano-Mascarua G.I., (1996). Plantas medicinales utilizadas por los mazahuas del municipio de San Felipe del Progreso. Estado de México. Tesis de Licenciatura (Biología).Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, pp.271.
- Marčetić, M. D., Milenković, M. T., Lakušić, D. V., & Lakušić, B. S. (2016). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil and Methanol Extract of *Hypericum aegypticum* subsp. webbii (Spach) N. Robson. *Chemistry & biodiversity*, 13(4), 427-436.
- Maurya, K. K., Semwal, B. C., Singh, N., Srivastava, V., y Ruqsana, K. (2012). Chronopharmacology: a tool for therapy of diseases. *Inter Res J Pharm*, 3, 128-32.

- Mercado López, C., & Díaz Muñoz, M. (2011). Tic-Tac biológico: ¿cómo medimos el tiempo?. *Revista Digital Universitaria*. Volumen 12 Número 3 • ISSN: 1067-6079
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287
- Msaada K, Taârit MB, Hosni K, Nidhal S, Tammar S, Bettaieb I, Hammami M, Limam F, Marzouk B. (2012). Comparison of Different Extraction Methods for the Determination of Essential oils and Related Compounds from Coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Acta Chim Slov.*59(4):803-13.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, (2010). Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Consultado: 14 de mayo de 2017. Recuperado en: http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, (1999). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Consultado: 17 de agosto de 2017. Recuperado en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
- OMS (2017). Depresión. Centro de prensa. Organización Mundial de la Salud. Consultado 13 de noviembre de 2017. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/es/>.
- OMS (2017). Día Mundial de la Salud 2017: La salud mental en el lugar de trabajo. Organización Mundial de la Salud. Consultado 13 de noviembre de 2017. Recuperado en: <http://www.who.int/mental-health/world-mental-health-day/2017/es/>
- Park, H. J., Lim, E. J., Zhao, R. J., Oh, S. R., Jung, J. W., Ahn, E. M., ... & Shim, H. S. (2015). Effect of the fragrance inhalation of essential oil from *Asarum heterotropoides* on depression-like behaviors in mice. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 43.
- Pennington, K., Focking, M., McManus, C.A., Pariante, C.M., Dunn, M.J., Cotter, D.R., (2009). A proteomic investigation of similarities between conventional and herbal antidepressant treatments. *J Psychopharmacol* 23, 520–530
- Périno-Issartier S, Ginies C, Cravotto G, Chemat F. (2013). A comparison of essential oils obtained from lavender via different extraction processes: Ultrasound, microwave, turbo hydrodistillation, steam and hydrodistillation. *Journal of Chromatography A*.1305:41-7
- Porsolt, R. D., Bertin, A., & Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, 229(2), 327-336
- Rahimi, R., Nikfar, S., Abdollahi, M., (2009). Efficacy and tolerability of *Hypericum perforatum* in major depressive disorder in comparison with selective serotonin reuptake inhibitors: a meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33, 118–127.

- Rajput, M. S., Sinha, S., Mathur, V., & Agrawal, P. (2011). Herbal antidepressants. *International Journal of Pharmaceutical Frontier Research*.(1), 159-69.
- Rodríguez Landa, J. F., & Contreras, M. (2000). Los fármacos antidepresivos y la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado: participación de los sistemas de neurotransmisión. *Arch.neurociencias*, 5(2), 74-83.
- Samojlik I, Mijatović V, Petković S, Skrbić B, Božin B. (2012).The influence of essential oil of aniseed (*Pimpinella anisum*, L.) on drug effects on the central nervous system. *Fitoterapia*.83(8):1466-73
- Santillán, M. (2012). El uso tradicional de las plantas medicinales, Un aporte para la ciencia. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 22(1), 1-2.
- Sari M, Biondi DM, Kaa[^]beche M, Mandalari G, D'Arrigo M, Bisignano G, Saija A, Daquino C, Ruberto G (2006) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *FlavFragr J* 21:890–898
- Sarris, J., Panossian, A., Schweitzer, I., Stough, C., Scholey, A., (2011). Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: a review of psychopharmacology and clinical evidence. *European Neuropsychopharmacology* 21, 841–860.
- Savage, K., Firth, J., Stough, C., & Sarris, J. (2017). GABA-modulating phytomedicines for anxiety: A systematic review of preclinical and clinical evidence. *Phytotherapy Research*.
- Sohrabi R, Pazgoohan N, Rezaei Seresht H, Amin B.(2017), Repeated systemic administration of the cinnamon essential oil possesses anti-anxiety and anti-depressant activities in mice. *Iran J Basic Med Sci*; 20:708-714.
- Taddei-Bringas, G.A., Santillana-Macedo, M.A. Romero-Cancio, J.A. Romero-Téllez, M.B. (1999). Acceptance and use of therapeutic medical plants in family medical care. *Salud Publica Mex*, 41, pp. 216-220
- Tortoriello, J., & Romero, O. (1992). Plants used by Mexican traditional medicine with presumable sedative properties: an ethnobotanical approach. *Archives of medical research*, 23(3), 111-116.
- Valdés, J. and H. Flores. (1985). Comentarios a la historia de las plantas de la Nueva España. In: *Obras completas de Francisco Hernández*, Tomo VII, 179. Universidad Nacional Autónoma de México, México
- Van der Werff, H. y Lorea F. (1997). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología. 58 pp.