



Actividad ansiolítica del extracto etanólico de las hojas de *Thymus vulgaris* (Tomillo) en *Rattus norvegicus*

Sergio Adrián Morales Vergara¹

Información del artículo

Historia del artículo

Recibido: 24/08/2018

Aprobado: 12/09/2018

Autor corresponsal

Sergio Adrián Morales Vergara
smoralesv543@hotmail.com

Financiamiento

Autofinanciado

Conflictos de interés

Ninguno

Financiamiento

Autofinanciado

Citar como

Lauro Roca LJ. Eficacia de la meditación trascendente – método Xirione en reducción de ansiedad - estado en pacientes con trastorno mixto ansioso – depresivo. Rev Peru Med Integrativa.2018;3(2):85-90.

Resumen

Objetivo. Demostrar que la administración vía oral del extracto etanólico de las hojas de *Thymus vulgaris* presenta un efecto ansiolítico en *Rattus norvegicus* (var Wistar). **Materiales y métodos.** Estudio experimental. Se utilizaron 50 ratas distribuidas aleatoriamente en cinco grupos de investigación: Blanco (dieta normal con administración de agua estéril); Control positivo (dieta normal con administración de clonazepam 0.25 mg/kg); Grupo I (Extracto etanólico [EE] de *Thymus vulgaris* 50 mg / kg); Grupo II (EE de *Thymus vulgaris* 100 mg / kg) y Grupo III (EE de *Thymus vulgaris* 200 mg / kg). El efecto ansiolítico fue evaluado mediante el modelo de laberinto en cruz elevado, calculándose los tiempos de permanencia en brazo abierto, en brazo cerrado y los números de entrada en brazo abierto y cerrado. **Resultados.** Se observaron diferencias significativas en la comparación de medias de los números de entrada en el brazo abierto ($p = 0.012$) y en el brazo cerrado ($p = 0.035$); sin embargo, no se evidenció diferencias significativas al comparar las medias de los grupos que recibieron *Thymus vulgaris* y el control negativo ($p > 0.05$). **Conclusión.** El extracto etanólico de las hojas del *Thymus vulgaris* (a dosis de 50, 100 y 200 mg/kg) no presenta un efecto ansiolítico significativo en *Rattus norvegicus*.

Palabras clave: Thymus (Planta); Ansiolíticos; Clonazepam, Experimentación Animal (Fuente: DeCS)

Anxiolytic activity of *Thymus vulgaris* leaf ethanolic extract in *Rattus norvegicus*

Abstract

Objective. To demonstrate if oral administration of *Thymus vulgaris* leaves ethanolic extract has an anxiolytic effect in *Rattus norvegicus* (Wistar var). **Materials and methods.** An experimental study. Fifty rats were distributed randomly in five research groups: Negative control (normal diet with distilled water oral administration); Positive control (normal diet with oral administration of clonazepam 0.25 mg / kg); Group I (*Thymus vulgaris* ethanolic extract [EE] 50 mg / kg); Group II (*Thymus vulgaris* EE 100 mg / kg) and Group III (*Thymus vulgaris* EE 200 mg / kg). The anxiolytic effect was evaluated by elevated plus-maze model, calculating amount of time spent as well as the total number of entries on open arm and closed arm. **Results.** Significant differences were observed in the comparison of means of entries in the open arm ($p = 0.012$) and in the closed arm ($p = 0.035$); however, no significant differences were found on comparison of means of groups that received *Thymus vulgaris* EE and negative control ($p > 0.05$). **Conclusion.** The *Thymus vulgaris* leaves ethanolic extract (at doses of 50, 100 and 200 mg / kg) does not show a significant anxiolytic effect in *Rattus norvegicus*.

Keywords: *Thymus* Plant; Anti-Anxiety Agents; Clonazepam; Animal Experimentation (Source: MeSH)

¹ Estudiante de Medicina. Universidad Peruana Antenor Orrego (UPAO)

Introducción

Los trastornos de ansiedad son unos de los más frecuentes a nivel mundial, se estima que su prevalencia puede ir entre el 10%-14%, lo que se incrementa en ciertas etapas de la vida como la adolescencia y la vejez ^[1]. En Perú, la prevalencia de estos trastornos en la población adulta se estima en 8% ^[2]; sin embargo, estas patologías se encuentran dentro del grupo que representa la mayor carga de enfermedad a nivel nacional (17.4%) ^[3]. Estos trastornos se pueden dividir en varios subtipos, destacando principalmente dos: el rasgo de ansiedad, definido como un tipo de personalidad que presenta una respuesta de ansiedad crónica ante estímulos estresantes; y el estado de ansiedad, que es más compatible con una respuesta consciente y transitoria ^[4].

Gran parte de las estrategias terapéuticas para estos trastornos se basan en el suministro de fármacos, denominados ansiolíticos, los cuales si bien han demostrado eficacia terapéutica, poseen un estrecho margen de seguridad y efectos secundarios no deseados como dependencia, síndrome de abstinencia, relajación muscular, obnubilación, cansancio, incremento del tiempo de reacción, incoordinación motora, deficiencia de las funciones mentales y motoras, entre otros ^[5,6].

Ante esta situación, los pacientes afectados se encuentran siempre en búsqueda de otras opciones terapéuticas que puedan complementar el tratamiento brindado por el médico tratante. Es así, que, en el caso de Perú, reportes previos han mostrado que los trastornos de ansiedad llegan a representar el 10.6% de los motivos de consulta en centros y unidades de medicina complementaria del Seguro Social de Salud (EsSalud) ^[7]

Una de las terapias complementarias más comúnmente consumidas en nuestra población ^[8] y en los servicios de medicina complementaria es el uso de plantas medicinales ^[7]. Dentro de la gran variedad de estos recursos disponibles en Perú, se ha reportado el uso tradicional de *Thymus vulgaris* "Tomillo" en casos de ansiedad y agitación psicomotriz ^[9].

Thymus vulgaris es una planta medicinal aromática perteneciente a la familia Lamiaceae, que crece como un pequeño arbusto de aproximadamente 25 cm de alto, con tallo y ramas cuadrangulares, sus hojas miden 6 a 12mm de largo y son de forma oval, gruesa y lisa ^[10]. Esta especie se caracteriza por su gran capacidad de adaptación, aunque crece mejor en suelos arenosos, con clima entre frío y templado, una humedad relativa entre 50 y 70%, en un campo abierto y a una altitud que oscila entre 0 y los 2500 msnm ^[11].

Se ha encontrado una gran variedad de compuestos químicos en los extractos derivados de *Thymus vulgaris*, destacando la presencia de aceites esenciales, sustancias fenólicas y flavonoides, los que pueden ser responsables de la mayoría de efectos biológicos ^[12]. Por otro lado, un estudio previo mostró al suministrar una solución de timol, sustancia presente en el *Thymus vulgaris*, a un modelo in vivo, se encontró una acción similar a la del GABA, produciendo relajación muscular ^[13].

Por ello, el objetivo del presente estudio es demostrar que la administración vía oral del extracto etanólico de las hojas del *Thymus vulgaris* presenta un efecto ansiolítico en *Rattus norvegicus* (var Wistar).

Materiales y métodos

Material Vegetal

El espécimen vegetal fue adquirido de un proveedor quien trajo la planta *Thymus vulgaris* desde su localidad de origen (Arequipa). Se procedió luego a identificar la planta en el Herbario de la Universidad Privada Antenor Orrego de la ciudad de Trujillo-Perú (Código HAO N°20039).

Preparación del Extracto Etanólico (EE)

Se recolectaron hojas de *Thymus vulgaris* y con el apoyo de químicos farmacéuticos de la Farmacia Natural del Centro de Atención de Medicina Complementaria de EsSalud de Trujillo, se realizó el proceso de extracción etanólica de las hojas de esta planta. Este proceso consistió en dejar secar las hojas en un ambiente a 22.3° C debajo y sobre papel Kraft por 24 horas para luego ser terminadas de secar por medio de una Estufa Memmert/UN110Plus ® a 45.0°C por 24 horas más. Seguidamente fueron trituradas por medio del uso de un Tamiz de 850 micras, y se procedió a la extracción por el método de percolación con etanol al 70 % a temperatura ambiente en el Centro de Atención de Medicina Complementaria de EsSalud.

El extracto obtenido se llevó al laboratorio de la Universidad Nacional de Trujillo para realizar el proceso de evaporación por medio de un Rota-Vapor, a través del cual del cual se eliminó la mayor parte del etanol utilizado para la extracción. Lo resultante se dejó secar a 40° C con ayuda de una Estufa. Por motivos de no disponibilidad del dispositivo necesario no se pudo realizar el proceso final de liofilización. En su lugar, se colocó el extracto etanólico en placas Petri y se dejó secar por 72 horas en la Estufa a 45.0° C para posteriormente ser raspado con el uso de una hoja bisturí, el

polvo resultante de consistencia acaramelada se redosificó en el Hospital Víctor Lazarte Echegaray en agua estéril para la administración futura a 6.5mg/ mL.

Animales de Experimentación

La población de estudio fue constituida por 50 ratas (*Rattus norvegicus*) hembras, de la variedad Wistar, con pesos entre 100 a 150 gramos y con edades entre 2 a 6 meses, provenientes del bioterio de la Universidad los Ángeles de Chimbote (ULADECH) en aparente buen estado de salud (Certificado Sanitario N°05-2018). Los animales – en número de 10 – fueron colocados en jaulas de acero inoxidable y plástico de 50 x 30 x 20 cm³ con la finalidad de que en un número reducido y en un ambiente amplio puedan evitarse situaciones de estrés y/o agresividad entre ellas mismas ^[14].

Posteriormente, pasaron por un periodo de adaptación de tres días en las instalaciones del Laboratorio de Farmacia de la Facultad de Medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego, a una temperatura de 20 +/- 2° C, con un ciclo regular de luz – oscuridad (12:12) y fueron alimentados libremente con agua y alimento para roedores (5% de fibra baja, 20% de proteínas y 5-10% de grasas).

El presente estudio contó con la aprobación del Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego de Trujillo. Además, el personal investigador presentó una capacitación previa en la manipulación de animales de experimentación con la finalidad de garantizar el adecuado manejo de los mismos y la concientización del respeto y el derecho de todo ser vivo en cuanto a su participación en pro del desarrollo de la ciencia y el desarrollo del conocimiento científico.

Modelo experimental

Después del periodo de aclimatación, los animales de experimentación fueron distribuidos aleatoriamente en número de 10 para cada uno de los cinco grupos de investigación ^[15]: Blanco (dieta normal con administración de agua estéril); Control positivo (dieta normal con administración de clonazepam a concentración de 0.25 mg/kg); Grupo I (EE de *Thymus vulgaris* a concentración de 50 mg / kg); Grupo II (EE de *Thymus vulgaris* a concentración de 100 mg / kg) y Grupo III (EE de *Thymus vulgaris* a concentración de 200 mg / kg). Los procesos de redosificación de las sustancias estudiadas fueron realizados en los ambientes del servicio de Farmacia del Hospital Nacional Víctor Lazarte Echegaray y estuvieron a cargo de un químico-farmacéutico. Todas las intervenciones fueron suministradas vía oral con ayuda de una sonda orogástrica.

Modelo de Respuesta no Condicionada (Laberinto Elevado en Cruz)

Se construyó un modelo de Laberinto Elevado en Cruz conformado por dos brazos abiertos (L: 50 cm x A: 10 cm), sin paredes laterales ni techo, dispuestos perpendicularmente a dos brazos cerrados por paredes laterales de madera, desprovistos de techo (L: 50 cm x A: 10 cm x H: 0 cm). Alrededor de los brazos abiertos fueron acopladas láminas de madera que tuvieron 1 cm de altura, con la intención de evitar que los animales caigan del laberinto; acorde a las especificaciones elaboradas por Pellow y col ^[16].

Cada animal de experimentación fue colocado en el centro del laberinto y se le permitió explorarlo por 10 minutos; al finalizar este tiempo de exploración, se colocó al sujeto en otra jaula diferencial. Antes de colocar al siguiente sujeto, se limpiaron los cuatro brazos del laberinto, retirando cualquier residuo dejado por el animal durante su periodo de exploración, pasando por las paredes y los pisos de los brazos del laberinto un paño humedecido en alcohol (10 %). Esto se realizó con el objetivo de evitar la presencia de claves odoríferas dejadas por el sujeto colocado previamente, y que eventualmente puedan influir sobre el comportamiento exploratorio del siguiente sujeto.

Este proceso fue registrado con ayuda de una videocámara, la que permitió obtener los tiempos en segundos de permanencia en brazo abierto, en brazo cerrado y los números de entrada en brazo abierto y cerrado.

Análisis Estadístico.

La información recolectada fue tabulada en una base de datos elaborada en Microsoft Excel 2016[®], y fue expresada en promedios ± desviaciones estándar, ya que las variables cumplieron con mostrar una distribución normal. Para evaluar si existieron diferencias significativas entre los tiempos o número de entradas y los grupos de estudio, se usó la prueba de ANOVA de una vía, con post-hoc de Dunnett. Estas pruebas fueron realizadas con ayuda del programa IBM SPSS para Windows Versión 20.0 (2011), IBM Corp[®].

Resultados

Durante el periodo de adaptación y administración del medicamento, por razones desconocidas, fallecieron 13 ratas y una enfermó, obteniéndose 14 exclusiones en el análisis (cinco del grupo que recibió el EE de *Thymus vulgaris* a una dosis de 200mg/kg, cuatro del grupo control negativo,

tres del grupo control positivo, uno de los que recibieron *Thymus vulgaris* a 100mg/kg y uno de los que recibieron *Thymus vulgaris* a 50mg/kg), quedando un total de 36 ratas Wistar quienes fueron evaluadas en el Laberinto en Cruz Elevado, y fueron ingresadas al análisis estadístico.

Al evaluar la distribución de las variables de estudio, se observaron diferencias significativas en la comparación de medias de los números de entrada en el brazo abierto ($p=0.012$) y en el brazo cerrado ($p=0.035$) (Tabla 01).

Al realizar las pruebas post-hoc correspondientes, se encontró que, en el caso del número de entradas al brazo abierto, había diferencias significativas entre el grupo que recibió EE 200 mg/kg ($p=0.003$; $\Delta=-6$ entradas) y el control negativo ($p=0.026$; $\Delta=-4$ entradas), en comparación con el control positivo. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos intervenidos con *Thymus vulgaris* con las medias mostradas por el grupo control negativo (Gráfico 01).

En forma similar, se realizó el análisis post-hoc en los valores obtenidos de número de entradas en el brazo cerrado, encontrándose diferencias significativas entre las medias del grupo que recibió EE 50 mg/kg ($p=0.024$; $\Delta=-8$ entradas) y EE 200 mg/kg ($p=0.020$; $\Delta=-10$ entradas) en comparación con el control positivo (clonazepam). Cabe destacar que en esta oportunidad no se encontraron diferencias entre las medias del control positivo y el control negativo ($p=0.096$) (Gráfico 02).

DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados del presente estudio, no se encontraron diferencias significativas en todos los

parámetros a evaluar entre los grupos a los que se les administró extractos etanólicos de *Thymus vulgaris* a dosis de 50 mg/kg, 100 mg/kg y 200 mg/kg; y lo calculado en el control negativo (placebo). Komaki y col publicaron un estudio similar desarrollado, en el cual se evaluó el efecto del extracto hidroalcohólico de *Thymus vulgaris* en las mismas dosis del presente estudio, y se encontró un incremento de las entradas en brazo abierto y en el tiempo de permanencia en este brazo en comparación del control, en dosis de 200 mg/kg^[17].

Por otro lado, Satou y col evaluaron el efecto ansiolítico del aceite esencial de *Thymus vulgaris* en ratones machos, utilizando también el método del laberinto en cruz elevada, en donde se encontraron resultados similares a los nuestros; sin embargo, los autores reportan que cuando usaron modelos murinos de fatiga cerebral con poli I:C (Polyinosinic:polycytidylic acid) si se encontró una mayor cantidad de entradas al brazo abierto, siendo esta diferencia estadísticamente significativa al compararla con un control negativo^[18]. Estos resultados son consistentes con los encontrados por Negromonte Souto-Maior y col, al usar óxido de linalol por vía inhalatoria, quien también encontró un aumento en las entradas al brazo abierto en el laberinto en cruz elevada^[19].

El laberinto en cruz elevada es una técnica validada para la medición de ansiedad en modelos animales, como en ratones o ratas, es fácil de aplicar, no es costoso y no requiere un entrenamiento o preparación especial en los sujetos de experimentación^[20]. Según la técnica, se asume que los fármacos con efecto ansiolítico incrementan las entradas a los brazos abiertos, mientras que los que tienen efecto ansiogénico, aumentan los ingresos a brazos cerrados^[21].

Tabla 1. Distribución de los parámetros del modelo de Respuesta no Condicionada (Laberinto Elevado en Cruz) por grupo de estudio.

Variable	Grupo de Estudio					Valor p ^(*)
	EE 50 mg/kg	EE 100 mg/kg	EE 200 mg/kg	Control negativo	Control positivo	
Tiempo en Brazo abierto (s)	79,8 ± 66,9	71,7 ± 45,8	33,0 ± 38,9	45,0 ± 29,8	77,1 ± 27,1	0,309
Tiempo en Brazo cerrado (s)	490,7 ± 75,7	495,3 ± 67,3	559,0 ± 51,2	531,7 ± 42,6	494,3 ± 15,9	0,190
# entradas en brazo abierto	4,3 ± 3,6	4,6 ± 2,6	1,6 ± 2,1	3,17 ± 2,2	7,6 ± 2,4	0,012
# entradas en brazo cerrado	8,9 ± 5,8	10,6 ± 7,0	7,2 ± 3,6	10 ± 5,9	17,4 ± 5,4	0,035

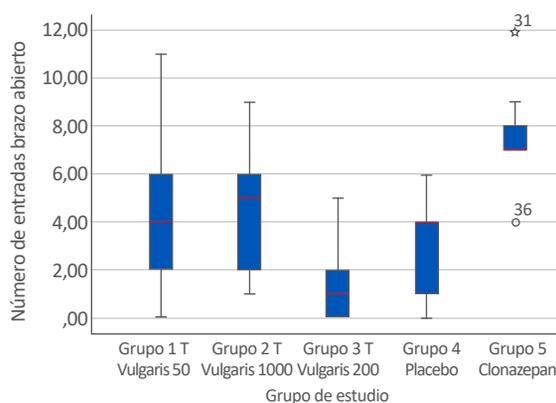


Gráfico 01. Número de entradas en brazo abierto por grupo de estudio.

En el presente estudio, si bien es cierto que se encontraron diferencias significativas en las entradas al brazo abierto, el mejor desempeño siguió siendo atribuible al clonazepam, suministrado al grupo control positivo. Se pueden postular algunas explicaciones a las discordancias encontradas con otros estudios, en primer lugar, un incorrecto proceso de adaptación y aclimatación puede determinar la aparición de conductas que el animal haya tenido previamente. Por ejemplo, Salum y col, en un análisis basado por modelos computacionales, encontró que algunas ratas mostraban preferencia por entrar primero a los brazos abiertos, sin ningún otro tipo de estímulo^[22]; esto podría relacionarse con los resultados obtenidos por Satou y col, quienes encontraron efectos terapéuticos solo en ratas estresadas^[18].

Otro evento a considerar en el desarrollo de este estudio, es la tasa de mortalidad y morbilidad encontrada en los animales de experimentación, a pesar de que se garantizó iguales condiciones de luminosidad y temperatura para cada rata dado que solo se disponía de un Laberinto en Cruz Elevado y el proceso de filmación y limpieza de residuos duraba aproximadamente nueve horas. Los estudios previos que han evaluado la toxicidad de aceites esenciales de *Thymus*

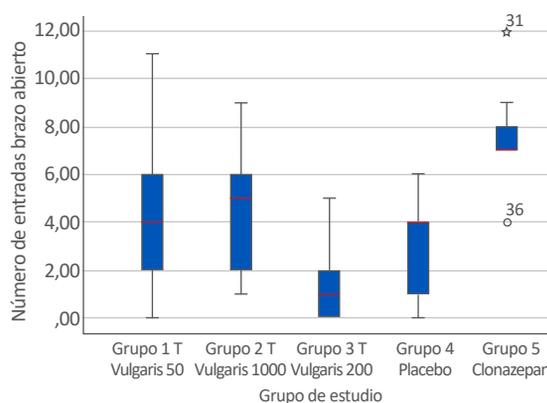


Gráfico 02. Número de entradas en brazo cerrado por grupo de estudio.

vulgaris, no han encontrado resultados que sugieran algún tipo de efecto letal en animales de experimentación que han recibido extractos polifenólicos, aceites esenciales o extractos acuosos, a dosis variables hasta los 1000 mg/kg^[23,24]. Por ende, la hipótesis de que la administración directa del extracto puede haber causado la muerte de los animales de experimentación, es bastante alejada aunque no totalmente improbable.

Por ende, si bien estas deficiencias limitan la validez de los resultados obtenidos, no lo descartan como una primera experiencia en el estudio de esta especie vegetal que es popularmente usada por la población. Se recomienda que futuros estudios repitan esta experiencia y corroboren los resultados obtenidos, manteniendo las garantías necesarias en el proceso de adaptación y durante la ejecución del estudio.

Finalmente, se concluye que la administración del extracto etanólico de las hojas de *Thymus vulgaris* (a dosis de 50, 100 y 200 mg/kg) no presenta un efecto ansiolítico significativo en *Rattus norvegicus* evaluadas mediante el método del laberinto de cruz elevada.

Referencias bibliográficas

1. Bandelow B, Michaelis S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues Clin Neurosci* 2015;17(3):327–35.
2. Piazza M, Fiestas F. Prevalencia anual de trastornos y uso de servicios de salud mental en el Perú: Resultados del estudio mundial de salud mental, 2005. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 2014;31(1):30–8.
3. Valdez-Huarcaya W, Miranda-Monzón J. Carga de Enfermedad en el Perú. Estimación de los años de vida saludables perdidos 2012. [Internet]. Lima: Ministerio de Salud; 2014. Available from: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/Cargaenfermedad2012.pdf>
4. Julian L. Measures of Anxiety. *Arthritis Care Res (Hoboken)* [Internet] 2011 [citado 2018 nov 26];63(11). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3879951/>

5. Gautam S, Jain A, Gautam M, Vahia VN, Gautam A. Clinical Practice Guidelines for the Management of Generalised Anxiety Disorder (GAD) and Panic Disorder (PD). *Indian J Psychiatry* 2017;59(Suppl 1):S67–73.
6. National Institute for Health and Care Excellence. Anxiety disorders [Internet]. 2014 [citado 2018 nov 26]; Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/qs53>
7. López MV, Cuba EY, Celis CA, Huamán DA, Angulo-Bazán Y, Pimentel SA. CARACTERIZACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE MEDICINA COMPLEMENTARIA EN PACIENTES DE ESSALUD-PERÚ. 2010-2014. *Revista Peruana de Medicina Integrativa* [Internet] 2016 [citado 2016 jun 21];1(1). Available from: <http://rpml.pe/ojs/index.php/RPMI/article/view/002>
8. Mejía Gálvez JAM, Carrasco E, Miguel JL, Flores SA. Conocimiento, aceptación y uso de medicina tradicional peruana y de medicina alternativa/complementaria en usuarios de consulta externa en Lima Metropolitana. *Revista Peruana de Medicina Integrativa* 2017;2(1):47.
9. Cardenas J. Validación del efecto sedativo, antiedematizante y toxicidad de *Valeriana officinalis* (Valeriana); *Melissa officinalis* (Melisa); *Thymus vulgaris* (Tomillo); *Foeniculum vulgare* (Hinojo); *Passiflora incarnata* (Flor de la Pasión o Maracuyá). 2012;
10. Naghdi Badi H, Yazdani D, Ali SM, Nazari F. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products* 2004;19(3):231–6.
11. Castro D, Díaz J, Serna R, Martínez M, Urrea P, Muñoz K, et al. Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales. 2ª ed. Colombia: Universidad Católica de Oriente; 2013.
12. Hossain MA, AL-Raqmi KAS, AL-Mijizy ZH, Weli AM, Al-Riyami Q. Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013;3(9):705–10.
13. Waliwitiya R, Belton P, Nicholson RA, Lowenberger CA. Effects of the essential oil constituent thymol and other neuroactive chemicals on flight motor activity and wing beat frequency in the blowfly *Phaenicia sericata*. *Pest Manag Sci* 2010;66(3):277–89.
14. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. [Internet]. 8ª ed. Washington DC: The National Academies Press; 2011. Available from: <http://nap.edu/12910>
15. García-García JA, Reding-Bernal A, López-Alvarenga JC. Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Inv Ed Med* 2013;2(8):217–24.
16. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14(3):149–67.
17. Komaki A, Hoseini F, Shahidi S, Baharlouei N. Study of the effect of extract of *Thymus vulgaris* on anxiety in male rats. *J Tradit Complement Med* 2015;6(3):257–61.
18. Satou T, Hayakawa M, Goto Y, Masuo Y, Koike K. Anxiolytic-like effects of essential oil from *Thymus vulgaris* was increased during stress. *Flavour and Fragrance Journal* 2018;33(2):191–5.
19. Souto-Maior FN, Carvalho FL de, Morais LCSL de, Netto SM, de Sousa DP, Almeida RN de. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2011;100(2):259–63.
20. Mora Gallegos A, Salas Castillo S. Modelos animales de miedo y ansiedad: descripciones neuro-conductuales. *Actualidades en Psicología* 2014;28(117):1.
21. McNaughton N, Zangrossi H. Chapter 2.1 Theoretical approaches to the modeling of anxiety in animals [Internet]. En: Blanchard RJ, Blanchard DC, Griebel G, Nutt D, editores. *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier; 2008 [citado 2018 dic 6]. página 11–27. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569733907000021>
22. Salum C, Morato S, Roque-da-Silva AC. Anxiety-like behavior in rats: a computational model. *Neural Netw* 2000;13(1):21–9.
23. Luaibi NM. Evaluation of Possible Toxic Effects of *Thymus vulgaris* leave Extract on Thyroid Function and Fertility in Male Rats. *Journal of Global Pharma Technology* [Internet] 2017 [citado 2018 dic 6];0(0). Available from: <http://www.jgpt.co.in/index.php/jgpt/article/view/505>
24. Benourad F, Kahvecioglu Z, Youcef-Benkada M, Colet J-M. Prospective evaluation of potential toxicity of repeated doses of *Thymus vulgaris* L. extracts in rats by means of clinical chemistry, histopathology and NMR-based metabonomic approach. *Drug Test Anal* 2014;6(10):1069–75.