

T  
1185

XXI INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES DE INFORMACION  
ARCHIVO HISTORICO

124219

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

---

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Evaluación de la actividad ansiolítica de *Tilia americana*  
var. *mexicana* (Schltdl.) Hardin y *Ocimum basilicum* Linn.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA**

**M. en C. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ**

**Directores de tesis:**

Dr. Rubén Román Ramos

Dr. J. Enrique Jiménez Ferrer

**Asesor de tesis:**

Dr. Alejandro Zamilpa Alvarez

Noviembre del 2008

## **COMITÉ TUTORIAL**

### **DIRECTORES DE TESIS**

#### **DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS**

Profesor Titular, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa  
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

#### **DR. JESÚS ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER**

Investigador Asociado "D", Centro de Investigación Biomédica del Sur, IMSS  
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

### **ASESOR**

#### **DR. ALEJANDRO ZAMILPA ALVAREZ**

Investigador Titular, Centro de Investigación Biomédica del Sur, IMSS  
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

DCB.313.08

Octubre 22, 2008

**MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ**

**Presente**

Por este conducto, en respuesta a su solicitud le comunico que, la Comisión del Doctorado le nombran como sinodales a los Doctores Jaime Tortoriello García y Mariana Meckes Fisher. Por la Comisión al Dr. Ramón González Camarena

Se acepta la fecha propuesta que es el día martes 18 de noviembre a las 9:00 horas en la UAM-I.

Sin más por el momento, aprovecho para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**

"Casa abierta al tiempo"

**DRA. REYNA FIERRO PASTRANA**

Coordinadora

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

Av. San Rafael Atlixco NO 186, Col. Vicentina, Iztapalapa  
C.P. 09340, México, D.F., A.P. 55-535 Tel: 5804-65-51  
Correo electrónico: [cdcb@xanum.uam.mx](mailto:cdcb@xanum.uam.mx)

**UNIDAD XOCHIMILCO**

Calz. del Hueso 1000, Col. Villa Quietud  
A.P. 23-181, Coyoacán, 04960, México  
Tel: 5483-75-04 5483-70-00 Ext: 3185  
Correo: [doctocb@correo.xoc.uam.mx](mailto:doctocb@correo.xoc.uam.mx)

Los miembros de la Coordinación del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco, aprobaron la Tesis que presentó:

**M. en C. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ**

**El día 27 de Noviembre de 2008**

Sinodales:

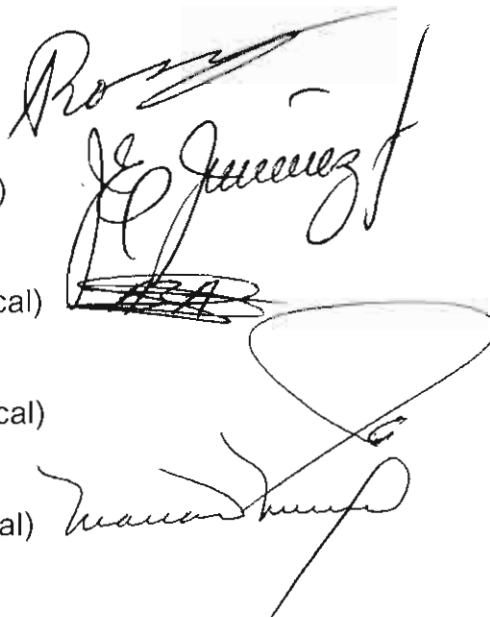
Dr. Rubén Román Ramos (Presidente)

Dr. J. Enrique Jiménez Ferrer (Secretario)

Dr. Alejandro Zamilpa Alvarez (Primer vocal)

Dr. Jaime Tortoriello García (Segundo vocal)

Dra. Mariana Meckes Fischer (Tercer vocal)

The image shows five handwritten signatures in black ink, arranged vertically on the right side of the page. The signatures are: 1. Rubén Román Ramos (President), 2. J. Enrique Jiménez Ferrer (Secretary), 3. Alejandro Zamilpa Alvarez (First vocal), 4. Jaime Tortoriello García (Second vocal), and 5. Mariana Meckes Fischer (Third vocal). The signatures are written in a cursive style.

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

La alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana, **Maribel Lucila Herrera Ruiz**, recibió beca del CONACYT de enero de 2006 a Julio de 2008, con el número de registro **92241**.

El presente trabajo se llevo a cabo en:



Laboratorio de Fitofarmacología del Centro de Investigación  
Biomédica del Sur del Intituto Mexicano del Seguro Social, Xochitepec  
Morelos.



Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de  
la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad  
Iztapalapa.

La presente investigación recibió financiamiento del Fondo para el Fomento a la  
investigación del IMSS con el número FOFOI: R-2006-1701-6

Con mi amor y admiración infinito, para la mujer que fue, es y será siempre mi  
fortaleza:

Gracias *Mamá* †

Con amor para dos hermosas niñas que llenan mi vida de luz y alegría:

*Emely D*

*E Mayte*

*Enrique*, por siempre todo mi amor



## *AGRADECIMIENTOS*

Dr. Rubén Román Ramos: gracias por ser un gran señor, un cálido ser humano y un gran doctor. Gracias por confiar en mí.

Dr. J. Enrique Jiménez Ferrer: por las palabras de aliento, por tu hombro, por ser mi maestro y amigo incondicional y por que siempre estoy aprendiendo de ti, con toda mi admiración gracias.

Dr. Alejandro Zamilpa Alvarez: gracias por ser mi gran amigo y por todo el apoyo y enseñanzas a lo largo de nuestro camino en el CIBIS.

Dr. Jaime Tortoriello: porque gracias a ti, a tu apoyo y confianza, estoy haciendo lo que me gusta.

Dra. Mariana Meckes: gracias por permitirme conocerla y darme cuenta de su calidez, sencillez y sabiduría.

## *A mi familia*

Por su amor y confianza:

A mis padres (José Ma. y Emelia<sup>†</sup>)

Mamita ¡te amo y te extraño tanto!, nunca olvidaré tu presencia mágica en mi vida y nunca dejaré de dar gracias a Dios y a la vida por haberte conocido y haber disfrutado del maravilloso ser humano que fuiste. Gracias también por ser ahora el ángel a quien me encomiendo.

Papá especialmente para ti, todo mi amor y todo mi agradecimiento por ser el pilar de lo que ahora soy.

A mis hermanos Erika, Ara, Pepe, ustedes saben cuanto los quiero y necesito, gracias siempre por estar conmigo en todos los momentos.

A Paco y a Rita, por ser parte de mi familia, los quiero mucho.

A mis pequeños sobrinos Julián, Joaquín, Ma. José, Monserrat, Erick y Atziri, los quiero muchísimo.

*A todos los amo.*

## *A mis amigos y compañeros de trabajo*

Ara Viazcan por todo su apoyo durante la realización de este trabajo.

A Ireneo, por su buen recibimiento, calidez, apoyo y compañerismo.

Por su ayuda a José Luis y Alberto.

Por sus palabras de aliento a Lolis, Yami, Yola García, Lydia Aguirre, Luky Valle, Tania, Gaby, Lucy, Maira, Guillermo, Daniel, Ofe, Manases.

Por querer compartir conmigo a Dante, Mariana, Liz, Nayeli, Ana, Carmen, Giovanni, Jonathan, Zully, Rodo, Javier, Maribel P, Eli.

<b>Índice general</b>	<b>Página</b>
Índice de cuadros	iv
Índice de figuras	v
Índice de diagramas	vi
Abreviaturas utilizadas	vii
<b>1. Resumen.</b>	1
<b>2. Abstract.</b>	3
<b>3. Introducción.</b>	4
<b>4. Antecedentes.</b>	5
4.1. Ansiedad.	5
4.1.1. Clasificación de la ansiedad.	6
4.1.2. Epidemiología de la ansiedad.	6
4.1.3. Mecanismos fisiopatológicos de la ansiedad.	7
4.1.3.1. Sistemas de neurotransmisión y ansiedad.	8
4.1.4. Tratamiento de la ansiedad.	10
4.1.5. Modelos biológicos.	12
4.1.5.1. Laberinto elevado en forma de cruz.	12
4.1.5.2. Modelo de campo abierto (CA).	12
4.1.6. Antecedentes de las especies vegetales.	14
4.1.6.1. <i>Tilia americana</i> var. mexicana (Schitdl) Hardin	14
4.1.6.1.1. Aspectos etnobotánicos y usos	14
4.1.6.1.2. Aspectos químicos	15
4.1.6.1.3. Aspectos farmacológicos	17
4.1.6.2. <i>Ocimum basilicum</i> Linn	18
4.1.6.2.1. Aspectos etnobotánicos y usos	18
4.1.6.2.2. Aspectos químicos	19
4.1.6.2.3. Aspectos farmacológicos	20
<b>5. Justificación.</b>	23
<b>6. Hipótesis.</b>	24
<b>7. Objetivos.</b>	24
7.1. General	24

7.2. Particulares	24
<b>8. Material y reactivos</b>	<b>25</b>
8.1. Material biológico	25
8.1.1. <i>Tilia americana</i>	25
8.1.2. <i>Ocimum basilicum</i>	25
8.1.3. Animales de experimentación	25
8.2. Material para las pruebas biológicas y químicas	26
8.2.1. Material para la prueba de LEC y CA	26
<b>9. Métodos</b>	<b>27</b>
9.1. Diseño experimental	27
9.2. Prueba de actividad ansiolítica en el LEC	29
9.3. Prueba de actividad motora espontánea en CA	29
9.4. Análisis, evaluación y preparación química	30
9.4.1. Método de análisis por HPLC	30
9.4.2. Obtención de los extractos, fracciones y compuestos	31
9.4.2.1. Extractos de <i>T. americana</i> de diferente polaridad	31
9.4.2.1.1. Fraccionamiento del extracto	
MeOH por bipartición entre fases	32
9.4.2.1.2. Fraccionamiento de F1	32
9.4.2.1.3. Purificación de la fracción F1C	34
9.4.2.1.4. Obtención de flavonoides puros para las	
pruebas biológicas (Tilirósido y F'15)	34
9.4.2.2. Extracto de <i>O. basilicum</i>	36
9.4.2.2.1. Bipartición del extracto HA	36
9.4.2.2.2. Extracto de hoja fresca	37
9.5. Análisis estadístico	37
<b>10. Resultados</b>	<b>38</b>
10.1. Análisis químico de <i>T. americana</i>	38
10.2. Evaluación biológica	41
10.3. Extractos de <i>T. americana</i>	41

10.4.	Fracciones F1, F2, F3 y F4	44
10.5.	Sub-fracciones F1A, F1B, F1C, F1D	47
10.5.1.	Tilirósido y F'15	49
10.6.	Extractos y fracciones de <i>O. basilicum</i>	51
<b>11.</b>	<b>Discusión</b>	54
<b>12.</b>	<b>Conclusiones</b>	62
<b>13.</b>	<b>Perspectivas</b>	63
<b>14.</b>	<b>Referencias bibliográficas</b>	64
<b>15.</b>	<b>Anexo I</b>	75
15.1.	Valoración de la actividad tóxica del extracto MeOH de <i>T. americana</i>	75
15.1.1.	Actividad TGP	76
15.1.2.	Actividad TGO	77
15.1.3.	Actividad de Creatinina	78
15.1.4.	Resultados del análisis de toxicidad	78
<b>16.</b>	<b>Anexo II</b>	79
16.1.	Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	79
16.1.1.	Método para la identificación del Tilirósido proveniente de la fracción activa de <i>T. americana</i>	80
16.1.2.	Resultados	80
<b>17.</b>	<b>Anexo III</b>	83
17.1.	Actividad ansiogénica de PTX en el LEC	83
17.1.1.	Animales y diseño experimental	83
17.1.2.	Resultados	84

<b>Índice de cuadros</b>	<b>Página</b>
Cuadro 1. Estructura química de algunas benzodiazepinas.	11
Cuadro 2. Algunos flavonoides aislados del género <i>Tilia</i> .	16
Cuadro 3. Estructura química de algunas flavonas de <i>O. americanum</i> .	21
Cuadro 4. Estructura química de algunos compuestos del género <i>Ocimum</i>	22
Cuadro 5. Esquema de administración de los diferentes tratamientos aplicados a partir de <i>T. americana</i> .	29
Cuadro 6. Esquema de administración de los diferentes tratamientos aplicados a partir de <i>O. basilicum</i> .	29
Cuadro 7. Rendimientos obtenidos durante el fraccionamiento de <i>T. americana</i> .	39
Cuadro 8. Estructura química de los flavonoides comerciales utilizados como estándares.	40
Cuadro 9. Datos de los espectros de absorción por HPLC del extracto MeOH de <i>T. americana</i> .	41
Cuadro 10. Datos de los espectros de absorción por HPLC de la fracción F1 de <i>T. americana</i> .	41
Cuadro 11. Datos de los espectros de absorción por HPLC de la fracción F1C de <i>T. americana</i> .	41
Cuadro 12. Evaluación de los extractos de <i>T. americana</i> en LEC	42
Cuadro 13. Evaluación de diferentes dosis del extracto MeOH en LEC	44
Cuadro 14. Extracto MeOH sobre parámetros de actividad motora	45
Cuadro 15. Evaluación de F1, F2, F3 y F4 en LEC	45
Cuadro 16. Fracciones F1, F2, F3 y F4 sobre parámetros de actividad motora	46
Cuadro 17. Evaluación de diferentes dosis de F1 en LEC	47
Cuadro 18. Evaluación de diferentes dosis de F1 sobre parámetros de actividad motora	47
Cuadro 19. Evaluación de las sub-fracciones en LEC	48
Cuadro 20. Sub-fracciones de F1 sobre parámetros de actividad	

	motora	49
Cuadro 21.	Evaluación de tilirósido en LEC	50
Cuadro 22.	Evaluación del F'15 en LEC	50
Cuadro 23.	Tilirósido y F'15 sobre parámetros de actividad motora	51
Cuadro 24.	Evaluación del extracto HA de <i>O. basilicum</i> en LEC	52
Cuadro 25.	Evaluación de las fracciones de <i>O. basilicum</i> en LEC	53
Cuadro 26.	Evaluación de la hoja fresca y fracciones de <i>O. basilicum</i> sobre parámetros de actividad motora.	54

<b>Índice de diagramas</b>	<b>Página</b>
----------------------------	---------------

---

Diagrama 1.	Procedimiento que se utilizó para la obtención de extractos de diferente polaridad obtenidos de <i>T. americana</i> .	32
Diagrama 2.	Procedimiento para la obtención de fracciones de diferente polaridad a partir del extracto MeOH activo de <i>T. americana</i> .	34
Diagrama 3.	Procedimiento utilizado para la obtención de la fracción F1.	36
Diagrama 4.	Procedimiento para la separación cromatográfica de F1C en columna abierta.	37



## Abreviaturas

1.	AcOEt	Acetato de etilo
2.	ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
3.	APG	The Angiosperm Phylogeny Group
4.	OMS	Organización Mundial de la Salud
5.	$\lambda$	Longitud de onda
6.	ATC	Antidepresivos tricíclicos
7.	CCC	Colecistocinina
8.	CCF	Cromatografía en capa fina
9.	Ce(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Sulfato cérico
10.	CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo
11.	CH <sub>3</sub> OH	Metanol, fórmula condensada
12.	CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
13.	CRH	Hormona Liberadora de Corticotrópina (CRH, por sus siglas en inglés)
14.	DL <sub>50</sub>	Dosis Letal al 50 %
15.	DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
16.	DZP	Diacepam
17.	FDA	Food Drug Administration
18.	GABA	Ácido $\gamma$ -amino butírico
19.	H <sub>2</sub> O	Agua
20.	HA	Extracto hidroalcohólico
21.	Hex	<i>n</i> -Hexano
22.	HPA	Eje Hipotálamo Pituitaria Adrenales
23.	HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés <i>High performance liquid chromatography</i> )
24.	IMAO	Inhibidores de la enzima Monoamino oxidasa
25.	ip	vía intraperitoneal

26.	L	Litros
27.	LEC	Laberinto elevado en forma de cruz
28.	MeOH	Metanol
29.	mGlu I	Receptores del neurotransmisor glutamato, metabotrópicos del grupo uno
30.	mGlu II	Receptores del neurotransmisor glutamato, metabotrópicos del grupo dos
31.	ml	Mililitros
32.	nm	Nanómetros
33.	PTX	Picrotoxina
34.	SNC	Sistema Nervioso Central
35.	SNRI	Inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina (SNRI, por sus siglas en inglés)
36.	SSRI	Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI, por sus siglas en inglés)
37.	TIL	Tilirósido
38.	UV	Ultravioleta
39.	vo	vía oral

## **Evaluación de la actividad ansiolítica de *Tilia americana* var. *mexicana* (Schlttdl.) Hardin y *Ocimum basilicum* Linn.**

### **1. Resumen**

En el mundo, las enfermedades neuro-psiquiátricas son las responsables de años de vida saludable perdidos, los trastornos mentales más comunes son el estrés y la ansiedad, su tratamiento se basa en la psicoterapia y la farmacoterapia; en esta última, son las benzodiazepinas los medicamentos más ampliamente utilizados por su acción rápida y efectos potentes, aun cuando después de su uso prolongado provocan efectos indeseables como dependencia y tolerancia.

En el campo de la investigación de fármacos con actividad ansiolítica, el modelo del laberinto elevado en forma de cruz (LEC) es uno de los más utilizados. Los compuestos ansiolíticos incrementan el porcentaje de tiempo que los animales permanecen en los brazos abiertos, mientras que los ansiogénicos disminuyen este parámetro. Por otro lado, el campo abierto (CA) es utilizado para distinguir y definir la actividad exploratoria.

Las brácteas y flores de *T. americana* se utilizan en la medicina tradicional mexicana para conciliar el sueño, calmar estados de excitación nerviosa acompañada de insomnio, dolor de cabeza y malestar en general. Como en otras especies del género *Tilia*, el contenido de flavonoides y glucósidos de flavonoides, en *T. americana* es importante. A su vez, *O. basilicum* se usa como sudorífico, para las sofocaciones, los nervios, enfermedades respiratorias, infecciones bucales y dolor estomacal. Es habitual en ceremonias religiosas y con la parte aérea se elaboran ramos de "limpia" para desalojar un "mal" y para el "susto". El género *Ocimum* contiene concentraciones elevadas de flavonoides pero no hay antecedentes sobre efectos de esta planta sobre SNC.

En el presente estudio se demostró el efecto ansiolítico del extracto metanólico de *T. americana* administrado vía oral en los ratones. El fraccionamiento químico mostró una fracción rica en los flavonoides rutina, canferol, quercetina, quercitrina y tilirósido con una importante actividad ansiolítica sin modificación la actividad motora de los animales. De la fracción activa se aislaron dos compuestos, uno de ellos

-  
identificado estructuralmente como tilirósido y el segundo, un probable flavonoide (aún no identificado) y que no tuvo actividad en los modelos animales utilizados. Los resultados en este estudio señalan que el tilirósido en combinación con los restantes flavonoides en la fracción activa serían los responsables de la actividad biológica.

Finalmente, el extracto hidroalcohólico de *Ocimum basilicum* mostró efecto ansiolítico significativo en el LEC, actividad biológica que no se detectó al fraccionar el extracto.

## 2. Abstract

The neuro-psychiatric disorders in the world are responsible of physical incapacity. The anxiety disorders had the highest overall prevalence rate among the mental disorders. Effective pharmacological and psychotherapeutic interventions are used for anxiety treatment. Benzodiazepines are still widely prescribed to reduce anxiety, due its efficacy. However, the long-term use with benzodiazepine provoked tolerance and dependence. The search of new anxiolytic drugs is supported of use of preclinical models like as the elevated plus-maze (EPM), which is being considered a reliable measurement instrument of animal anxiety – like behavior. The anxiolytics drugs induced to rodents spent more time in the open-arms, while the anxiogenic drugs provoked the animals spent less time in these spaces. On the other hand, the open field is used to measure the spontaneous motor activity.

The bract of *T. americana* var. *mexicana*, popularly known as “cirimbo”, have been used in Mexican traditional medicine for treating nervous disorders, insomnia, and headache. The flowers and fruits are used to treat colon spasm, menstrual irregularities, as an emollient, and for rheumatism. The species of *Tilia* genus contain flavonoides and its glycosides. The aerial parts of *O. basilicum*, known as albahaca, have been used as respiratory illness, stomached, also around spiritual ceremony in Mexican traditional medicine. The *Ocimum* genus has higher concentrations of flavonoides, but there are not reports about the nervous system effects of *O. basilicum*.

In this work we evaluated the anxiolytic effect of extracts, fractions administrated to mice (oral pathway) from *T. americana* and *O. basilicum* (employing the EPM test) and the actions on motor activity (open field test), the activity of tiliroside from *T. americana* was also analyzed. The flavonoid fraction of *T. americana* (rutin, kaempherol, quercitrin, quercitin and tiliroside) induced an anxiolytic-like effects without change the motor activity. The tiliroside and other flavonoid (no identified) were isolated from a biological active fraction of this plant; the tiliroside was active in the EPM test. The hydroalcoholic extract from *O. basilicum* induced anxiolytic effect on EPM test, when this extract was chemically fractionated the activity was not showed.

### 3. Introducción

El 25 % de los individuos en el mundo tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, presentan uno o más trastornos mentales o conductuales en alguna etapa de la vida <sup>WHO, 2001</sup>. Las enfermedades neuro-psiquiátricas son las responsables de años de vida saludable perdidos, se calcula que para el 2000 representaron el 12 % y que la cifra llegará hasta el 15 % en el 2020; son las principales causas de discapacidad y contribuyen con el 6.3 % de carga económica <sup>WHO, 2006</sup>. Se estima que los trastornos psiquiátricos más comunes son el estrés y la ansiedad. Algunos estudios epidemiológicos auspiciados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), basados en la clasificación de los trastornos de ansiedad propuesta por el Manual de Diagnóstico y Estadística de Trastornos Mentales (DSM IV, por sus siglas en inglés Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), indican que para el año 2000, los trastornos de ansiedad tuvieron una prevalencia del 25 %, cifra que fue mucho mayor que en los años anteriores (17 %) <sup>Kessler et al., 2002</sup>. El tratamiento de los trastornos de ansiedad se basa en la psicoterapia y la farmacoterapia; en esta última, son las benzodiacepinas los medicamentos más ampliamente utilizados por su acción rápida y efectos potentes, aun cuando después de su uso prolongado provocan efectos indeseables como dependencia y tolerancia. Otros tratamientos consisten en la administración de antidepresivos tricíclicos inhibidores de la recaptación de monoaminas e inhibidores de la enzima monoaminoxidasa, entre otros. La búsqueda de recursos terapéuticos para trastornos nerviosos a partir plantas medicinales ha crecido en los últimos años <sup>Zhang, 2004</sup>. En México, diferentes especies son utilizadas para el alivio de los trastornos mentales; en este trabajo se presentan los resultados de una investigación diseñada para evaluar el efecto ansiolítico y sobre la actividad motora espontánea de los extractos y fracciones de *T. americana* y de *O. basilicum* utilizando el modelo de laberinto elevado en forma de cruz y campo abierto, respectivamente.

## 4. Antecedentes

### 4.1. Ansiedad

La ansiedad se entiende a través de diferentes conceptos, algunos autores definen al miedo como "una respuesta normal ante una amenaza, la ansiedad sería por lo tanto un miedo inapropiado" <sup>Ninan, 1999</sup>. Otros, mencionan que la ansiedad es una emoción normal en circunstancias amenazadoras y se considera que forma parte de la reacción evolutiva de supervivencia de lucha o huida <sup>Stahl, 1998</sup>. Así entonces, se puede considerar que la ansiedad es un proceso fisiológico, común en los seres humanos, que se presenta en respuesta a estímulos externos o internos. Esta experiencia tiene un fuerte componente emocional asociado a una sensación de temor. Las reacciones que pueden presentar los individuos ante las amenazas pueden tener efectos benéficos, tales como una mejor ejecución de las tareas que se realizan. Sin embargo, frecuentemente causan estrés y puede, en algunos casos, tener efectos negativos profundos sobre la conducta, se considera patológica si se presenta en exceso o en una forma incontrolable. La ansiedad es muy común y se asocia con una alta morbilidad lo que trae consigo empeoramiento de la funcionalidad social y una reducción de la calidad de vida. Presenta una gran co-morbilidad con otros trastornos psiquiátricos y enfermedades crónicas. Los síntomas más comunes asociados a los trastornos de ansiedad son psicológicos como preocupación, pánico, sentimientos de no-realidad, miedo a volverse "loco", miedo a morir, miedo a perder el control.

Esta respuesta desproporcionada ante los estímulos ambientales puede sobre-activar al eje hipotálamo-pituitaria-adrenales y al sistema nervioso autónomo, dando como resultado manifestaciones somáticas de la ansiedad: alteración respiratoria, sudoración, náusea, taquicardia y elevación de la presión arterial, temblor, vértigo, tensión muscular, agitación, entumecimiento, dolor estomacal, sensación de hormigueo y trastornos del sueño <sup>Sandford et al., 2000</sup>.

De cualquier forma, la ansiedad constituye un conjunto de trastornos psiquiátricos que están agudizándose de manera sorprendente a nivel mundial; de hecho, la OMS estima que cerca de 450 millones de personas en el mundo sufren actualmente de trastornos mentales, neurológicos o de comportamiento derivados de la ansiedad.

#### 4.1.1. Clasificación de la ansiedad

El DSM IV agrupa un número de trastornos, cuya característica principal es la ansiedad anormal o inapropiada, en:

- Trastorno de ansiedad generalizada
- Trastorno de estrés agudo
- Trastorno obsesivo-compulsivo
- Trastorno de pánico (con o sin agorafobia)
- Agorafobia (con o sin una historia de trastorno de pánico)
- Fobias (incluyendo fobia social)
- Trastorno de estrés postraumático

#### 4.1.2. Epidemiología de la ansiedad

Estos problemas causan estrago familiar, social y económico, discapacidad, aislamiento social, disminución de la calidad de vida; tienden a ser crónicos y pueden ser tan discapacitantes como las enfermedades somáticas <sup>WHO, 2004</sup>. La ansiedad es una de las enfermedades psiquiátricas de mayor prevalencia, menos del 30% de los individuos que sufren este padecimiento están bajo tratamiento médico, en México este problema de salud afecta aproximadamente a 15 millones de mexicanos [www.insp.mx/Portal/Noticias/Marzo06/nolicia130306\\_2.html](http://www.insp.mx/Portal/Noticias/Marzo06/nolicia130306_2.html).

Estudios epidemiológicos recientes demuestran que los trastornos de ansiedad se presentan en un gran número de individuos, dando como consecuencia tasas de prevalencia de 13.6 y 28.8 % en los países occidentales. Aparentemente, las fobias específicas son los subtipos de ansiedad más frecuentes y es menos común el trastorno obsesivo-compulsivo.

En general, los trastornos de ansiedad se presentan en etapas relativamente tempranas de la vida. De un 80 a 90 % de los casos se manifiestan entre los 10 y 25 años de edad, periodo que parece ser el de mayor riesgo de desarrollar alguno de estos trastornos. Mucho del conocimiento epidemiológico de los trastornos mentales se ha obtenido a partir de las investigaciones realizadas en los países occidentales en desarrollo. Aun cuando existen al respecto algunos estudios en regiones menos desarrolladas, no se puede hacer un estudio comparativo debido al tipo de muestreo, herramientas de diagnóstico y tamaño de la muestra. En este sentido, la OMS lanzó un



proyecto para analizar la prevalencia que tienen los trastornos mentales en 28 países. Para el 2007 se había completado la encuesta de 14 países, los resultados indicaron que México tiene índices de prevalencia comparables con los de ciudades Europeas Valencia, 2007

#### 4.1.3. Mecanismos fisiopatológicos de la ansiedad

Las estructuras cerebrales que conforman el circuito de la ansiedad son varias, sin embargo, la corteza prefrontal (CPF) y la amígdala se consideran zonas con un papel primordial dentro del circuito. Éstas, gobiernan los sentimientos positivos y negativos de las emociones, modulan por lo tanto el estilo de vida de las personas y son de alguna manera las responsables de las diferencias individuales que se observan en la vulnerabilidad ante los trastornos de ansiedad. La amígdala tiene la función de detectar, coordinar y mantener las emociones que atemorizan a los individuos <sup>Kent et al., 2002</sup>, de esta manera, la amígdala es la responsable de la adquisición y expresión del miedo <sup>Pare et al., 2004</sup>. Este sentimiento es el principal síntoma asociado a todos los trastornos de ansiedad, representando uno de los principales objetivos de estudio en la investigación de la ansiedad ya que, su comprensión ha permitido entender mucho de la neurobiología de este trastorno <sup>Garankani et al., 2006</sup>. El hipocampo, el cíngulo anterior y la ínsula, también forman parte de este circuito y cada una de estas zonas contribuyen con diferentes componentes a la presencia de los trastornos de ansiedad <sup>Davidson, 2002</sup>. Para que los organismos orquesten las respuestas fisiológicas adecuadas ante los estímulos adversos y puedan regular los procesos de expresión de ansiedad dentro de la compleja red de estructuras cerebrales involucradas, es necesaria la participación de moduladores neuroquímicos, los cuales son capaces de interactuar con determinadas células afectando la actividad de todo el neurocircuito. Algunos neurotransmisores involucrados son péptidos, aminos como serotonina y norepinefrina; aminoácidos como glutamato y posiblemente el más estudiado de todos, el ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA).

#### 4.1.3.1. Sistemas de neurotransmisión y ansiedad

El GABA es el neurotransmisor inhibitor predominante del sistema nervioso central que ejerce su efecto a través de su unión con diferentes tipos de receptores: el complejo receptor-ionóforo de cloruro ( $GABA_A$ ), el receptor  $GABA_B$  y el receptor  $GABA_C$  Borman, 2000; Schousboe y Waagepetersen, 2008

En los trastornos de ansiedad, la participación del sistema GABAérgico a través del complejo receptor-ionóforo de cloruro ( $GABA_A$ ) está ampliamente documentada con investigaciones celulares, conductuales y clínicas. Está involucrado en el control de la coordinación motora, aprendizaje y memoria y, de manera importante, en los procesos de epileptogénesis y ansiedad Vicini, 2004.

El receptor ionotrópico  $GABA_A$  es una estructura pentamérica constituida de varias subunidades, cuyo acoplamiento mixto da lugar a subtipos de receptores con características farmacológicas propias Mehta *et al.*, 1999. Cada subunidad está arreglada alrededor de un poro central que constituye el canal iónico y tiene un dominio extracelular N-terminal que da lugar al sitio de unión del agonista o antagonista del neurotransmisor. El receptor tiene tres dominios que atraviesan la membrana (M1-3), un asa intracelular de longitud variable y un cuarto dominio que atraviesa la membrana (M4), con una C-terminal extracelular. Hay 16 diferentes subunidades que comprende la familia del receptor  $GABA_A$ :  $\alpha_1$ - $\alpha_6$ ,  $\beta_1$ - $\beta_3$ ,  $\gamma_1$ - $\gamma_3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ . La combinación fisiológica de estas subunidades está restringida a aquellas que contienen dos  $\alpha$ , dos  $\beta$  o una combinación con cualquiera de las otras subunidades. Estudios realizados con el receptor  $GABA_A$  nativo sugieren que puede haber menos de 20 combinaciones de las subunidades para dar lugar a diferentes subtipos de receptores  $GABA_A$  Rudolph y Möhler, 2006. Debido a su estructura, los receptores de esta familia llevan a una amplia diversidad farmacológica y fisiológica involucrada en diferentes trastornos neurológicos. Los receptores  $GABA_A$  prototipo ( $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ ) son selectivamente activados por muscimol, antagonizados competitivamente por bicuculina y no-competitivamente por picrotoxina Barnard *et al.*, 1998. Existe selectividad, lo que lleva a perfiles farmacológicos diferentes en varias regiones cerebrales, de tal forma que algunos de los subtipos de receptores difieren con respecto a su unión a las benzodiacepinas (BZD). El sitio de unión para diferentes fármacos dependerá de las combinaciones de las subunidades  $\alpha\gamma$  Corp *et al.*, 2002.

Por otro lado, los receptores metabotrópicos GABA<sub>B</sub> son heterodímeros, GABA<sub>B(1)</sub> y GABA<sub>B(2)</sub>, del primero se han identificado algunas isoformas: GABA<sub>B(1a)</sub> y GABA<sub>B(1b)</sub>, se encuentran abundantemente en el sistema límbico lo que puede indicar un papel importante en la regulación de la conducta emocional <sup>Bowery et al., 2002; Ong y Derr, 2005</sup>. Aún cuando existe evidencia acerca de que este tipo de receptores puede ser un blanco terapéutico importante en los trastornos de ansiedad, la evidencia farmacológica acumulada es limitada y la aplicación de agonistas a los receptores GABA<sub>B</sub> produce además de ansiolisis, efectos sobre la coordinación motora e hipotermia, como ocurre con el baclofen <sup>Cryan et al., 2004</sup>.

Además de la implicación del sistema GABAérgico, otros neurotransmisores como el glutamato, la serotonina y la norepinefrina participan en los trastornos de ansiedad. También algunos neuropéptidos como la hormona adrenocorticotrópica (ACTH, por sus siglas en inglés), la hormona liberadora de corticotropina (CRH, por sus siglas en inglés), el neuropéptido Y y la colecistocinina (CCC) juegan un papel importante en la ansiedad.

El glutamato ejerce su modulación a través de la interacción con sus receptores ionotrópicos como el NMDA (N-metil-D-aspartato) o AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) y receptores metabotrópicos (mGlu I y mGlu II). El bloqueo de la excitación basal del glutamato generada por la activación de los receptores ionotrópicos puede dar lugar a un efecto ansiolítico. Así, la administración de antagonistas de los receptores NMDA y no-NMDA (AMPA) provoca una disminución en la ansiedad <sup>Miserandino et al., 1990</sup>. La activación de los receptores mGlu tipo II reduce la ansiedad en algunos modelos animales e incluso en el humano <sup>Shoepp et al., 2003</sup>.

Las aminas biogénicas también participan en el circuito fisiopatológico de la ansiedad, se ha demostrado por ejemplo que las neuronas con señalización por serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) son capaces de interactuar con el eje hipotálamo-pituitaria-adrenales (HPA), de tal manera que la disfunción de esta interacción puede alterar la fisiología del HPA <sup>McAllister- Williams et al., 1998</sup>. El hipocampo recibe aferentes serotoninérgicas desde el núcleo de rafé medio, el cual está implicado en la ansiedad así como en las respuestas conductuales y neuroendocrinas al estrés <sup>File et al., 2000</sup>. Tanto el

glutamato, como la 5-HT modulan las conductas de defensa relacionadas con la ansiedad en la zona gris periacueductal dorsal <sup>Moraes et al., 2008</sup>.

La elevación de la neurotransmisión noradrenérgica por administración de yohimbina (un antagonista de los receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos) provoca ansiedad <sup>Charney, 1987</sup>. Por otro lado, el bloqueo de los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos en la amígdala central, induce un estado de estrés en ratones expuestos a la prueba de interacción social <sup>Morilak et al., 2005</sup>.

#### 4.1.4. Tratamiento de la ansiedad

El tratamiento de los trastornos de ansiedad involucra la prescripción de más de un fármaco y para establecer un tratamiento adecuado es necesario el diagnóstico del tipo de trastorno de ansiedad. Estas enfermedades frecuentemente presentan condiciones de co-morbilidad con estados de depresión, abuso de sustancias y de alcohol, e incluso otros trastornos de ansiedad.

El uso de fármacos con propiedades ansiolíticas data desde hace tiempo. A lo largo del siglo XX se dió un sustancial desarrollo a la obtención de medicamentos para el tratamiento de la ansiedad, el principal aporte se hizo en los 90s (“la década de la ansiedad”) con el avance que se produjo en conocimiento de las neurociencias. Aún cuando se ha generado un mayor comprensión de la fisiología del sistema nervioso central (SNC), el mecanismo de acción de los actuales agentes farmacoterapéuticos se vincula con un número reducido de sistemas de neurotransmisión, como son el GABAérgico, pero también el glutamatérgico en menor extensión y el sistema monoaminérgico con serotonina, noradrenalina y dopamina <sup>Nash y Nutt, 2005</sup>.

En la segunda mitad del siglo XX, las benzodiazepinas fueron los principales agentes utilizados en el tratamiento de la ansiedad; a pesar de sus efectos secundarios, estos compuestos siguen siendo en la actualidad una importante opción terapéutica. Por ejemplo (Cuadro 1), el triazolam, lormetacepam **1**, flunitracepam **2**, nitracepam, lorazepam **3** y diacepam **4** (este último el más representativo del grupo), son los ansiolíticos más utilizados en la práctica clínica. Estos fármacos actúan sobre el receptor GABA<sub>A</sub> incrementando el tiempo de hiperpolarización de la membrana neuronal como resultado del influjo del ion cloruro <sup>Davidson, 2004</sup>. El uso de estas

sustancias es extendido debido principalmente a su acción rápida y a que son bien toleradas; sin embargo, inducen efectos indeseables como somnolencia, mareo, sedación, pérdida del equilibrio, disminución de la habilidad psicomotora, confusión, astenia muscular, depresión respiratoria y probablemente los más graves de todos, tolerancia y dependencia <sup>Zjorumski, 1991</sup>.

En la década de los 90's, el tratamiento de la ansiedad incluyó el uso de antidepresivos como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI) lo que representó un avance terapéutico importante. También se ha establecido que los inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO), antidepresivos tricíclicos (ATC), inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina (SNRI) y azapironas son fármacos eficaces <sup>Mauk et al., 1988</sup>. A diferencia de las benzodiacepinas, el inicio de la terapia con algunos antidepresivos causan un incremento en el estado de ansiedad y el efecto ansiolítico ocurre después de la administración subcrónica del medicamento <sup>Rocca, 1997</sup>. Algunos efectos indeseables asociados a los antidepresivos son náusea, diarrea, insomnio, agitación, disfunción sexual, hipotensión postural. El síndrome de abstinencia que se presenta con el uso crónico de antidepresivos es menos severo que con las benzodiacepinas, aunque se ha reportado que la suspensión del tratamiento produce recaídas. La interrupción del uso de estos fármacos puede provocar mareos, tembor, vértigo, parestesia, confusión, problemas de memoria, dolor de cabeza, irritabilidad <sup>Nash y Nutt, 2005</sup>.

**Cuadro 1.** Estructura química de algunos ansiolíticos del grupo de las benzodiacepinas

	R1	R2	R3	R4
Lormetacepam 1	Cl	CH <sub>3</sub>	O	Cl
Flunitracepam 2	NO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	O	F
Loracepam 3	Cl	H	O	Cl
Diacepam 4	Cl	CH <sub>3</sub>	O	H

#### 4.1.5. Modelos biológicos

Los modelos animales constituyen una parte fundamental en la investigación preclínica de los trastornos psiquiátricos y son empleados en la búsqueda de nuevos fármacos y la elucidación de los mecanismos de acción de estas sustancias. La mayoría de los modelos utilizados se basan en el comportamiento y se clasifican en aquellos que estudian respuestas condicionadas y no-condicionadas frente a un estímulo capaz de producir ansiedad en el humano.

##### 4.1.5.1. Laberinto elevado en forma de cruz (LEC).

En el campo de la investigación de fármacos con actividad ansiolítica, el modelo del LEC es uno de los más utilizados <sup>Pellow *et al.*, 1985; Zhang, 2004</sup>. La prueba consiste en colocar a una rata o ratón en el centro de un laberinto en forma de cruz. Este dispositivo está diseñado con dos brazos abiertos y dos brazos cerrados en el que se deja que el animal explore libremente. Se ha sugerido que la renuencia que muestran los animales a entrar a los brazos abiertos se debe al miedo a los espacios desprotegidos más que al hecho de que sea un ambiente desconocido. Los compuestos ansiolíticos incrementan el porcentaje de tiempo que los animales permanecen en los brazos abiertos, mientras que los ansiogénicos disminuyen este parámetro <sup>Korte, 2003</sup>.

La permanencia de los animales en los brazos abiertos produce una elevación en los niveles de corticosterona en el plasma, mayor que la observada en los animales que transitan en los brazos cerrados, respuesta que otorga una validación fisiológica del modelo <sup>Pellow *et al.*, 1985</sup>.

##### 4.1.5.2. Modelo de campo abierto (CA)

Alrededor de los años 40s' la prueba de comportamiento llamada CA fue utilizada para medir el estrés en los animales. Este modelo etológico fue desarrollado por Calvin Hall en 1934, quien basó su trabajo particularmente en el estudio y las selecciones genéticas de ratas, de acuerdo a los diferentes estados emocionales (altas o bajas) que presentaban los animales ante un ambiente extraño. La valoración se sustentaba en la defecación que presentaban los roedores como respuesta a dicho estado emocional. Según Hall, la prueba de campo abierto representa una situación

desconocida para los animales y como respuesta a esta condición, presentan mayor número de evacuaciones lo que se traduce como un aumento en la "emocionalidad". Para Candland y Nagy <sup>1969</sup>, la defecación en respuesta a situaciones nuevas no se presenta en todas las especies, refiriendo además que los animales marcan su territorio de esta manera. Estos autores encontraron que también las respuestas como la deambulación y los estiramientos verticales (rearing) disminuyen en las pruebas sucesivas, debido probablemente a la adaptación del animal a la prueba y a la disminución de la emocionalidad. Experimentalmente se estableció la relación entre la defecación y estos niveles en la prueba de campo abierto, lo cual fue ampliamente aceptado por los psicólogos y farmacólogos como un índice de emocionalidad <sup>Dandiya et al., 1969, 1970</sup>. Kulkarni y Dandiya <sup>1974</sup> realizaron estudios utilizando agentes psicotrópicos en la prueba de campo abierto, lo que permitió distinguir y definir la actividad exploratoria. Además, demostraron que los estiramientos horizontales (sapping) y verticales (rearing) podían ser activados o inhibidos por agonistas o antagonistas de las catecolaminas, revelando una nueva utilidad del campo abierto para el estudio de fármacos ansiolíticos, así como para el estudio y exploración de la ansiedad.

4.1.6. Antecedentes de las especies vegetales

4.1.6.1. *Tilia americana* var. *mexicana*

4.1.6.1.1. Aspectos etnobotánicos y usos

Científicamente, esta especie se clasifica como <sup>Brands, 2000.</sup>

Dominio: Eucarionte

Reino: Plantae

Subreino: Viridaeplantae

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Superorden: Malvanae

Orden: Malvales

Familia: Tiliaceae (Malvaceae, APG)

Subfamilia: Tilioideae

Tribú: Tilleae

Género: *Tilia*

Especie: *Tilia americana* (Schltdl.) Hardin

(Figura 1)



**Figura 1.** Fotografía de las partes aéreas del árbol de *T. americana*, colectadas en Mexicapán, Estado de México.  
Foto: Alberto Ramos



La agrupación del género *Tilia* dentro de la familia Tiliaceae corresponde al sistema de clasificación taxonómica para plantas que florecen (o angiospermas) llamado "Sistema Cronquist", desarrollado por Arthur Cronquist en 1968. Este sistema clasifica las plantas en dos amplios grupos: dicotiledoneas y monocotiledoneas <sup>Cronquist, 1988</sup> y se basa en las similitudes y diferencias morfológicas de las especies. Sin embargo, algunos taxonomistas incorporan al género *Tilia* dentro de la familia Malvaceae, con base en un nuevo método de clasificación "The Angiosperm Phylogeny Group" (APG, por siglas en inglés) que se rige por la secuencia del ADN y el análisis Cladístico (clasificación jerárquica de las especies basado en un ancestro evolutivo, más que entre las similitudes). Este método refleja entonces la relación filogenética entre las especies que florecen <sup>APG II, 2003</sup>.

El nombre común de *T. americana* es tila, tilia, cirimbo, sirimo (purépecha), Sirimu, Tsirimu tsipata (purépecha). Crece en bosques de encino y bosques de pino, entre los 1300 y los 2400 msnm, es un árbol de tallo recto con corteza lisa que alcanza alrededor de 18 m de altura, con follaje vistoso, sus hojas alternas, simples, dentadas o lobadas, de color verde claro algunas con el borde en forma de sierra. Tiene hojas grandes, de 8 a 14 cm de largo, de figura de corazón, con los lados desiguales en la base y el ápice puntiagudo, de bordes irregularmente dentados, de verde oscuro y lampiñas en la haz, más pálidas y menudamente vellosas en la cara inferior, en esta cara o envés de la hoja, resalta mucho la nervadura, que es palmeada, con nervios secundarios o laterales <sup>Argueta, 1994; Bello, 1993; Martínez, 1987</sup>.

La parte aérea, sobre todos las brácteas y flores, es utilizada para conciliar el sueño, calmar estados de excitación nerviosa, dolor de cabeza y malestar en general <sup>Bello, 1993</sup>.

#### 4.1.6.1.2. Aspectos químicos

Estudios fitoquímicos previos realizados con algunas especies del género *Tilia* reportan el aislamiento de una serie de flavonoides y de sus correspondientes glicósidos (Cuadro 2 y 8) <sup>Zub, 1972</sup>.

La especie *T. americana* contiene principalmente sacáridos; entre ellos, el fucogalactoxiglucano, L-fucosa, D-galactosa, D-xilosa y D-glucosa. En las hojas de varias

poblaciones de esta especie, colectadas en Estados Unidos de América se ha observado cierta diferencia en el contenido de los metabolitos secundarios. Los ejemplares colectados en el Sur contienen principalmente 3-O-glucósido de quercetina **5** y 3,7-O-diglucósido de quercetina **6**. Estos flavonoides glucosilados no fueron detectados en las colectas realizadas en el norte <sup>Hockok and Anway, 1972</sup>. Algunas especies del género *Tilia* presentan leucocianidinas y proantocianidinas en diferentes órganos. Las antocianidinas identificadas fueron: pelargocianidina, cianidina y cloruro de delfinidina. Las concentraciones de este último compuesto en *T. platyphyllos* y *T. cordata*, excede el 0.70 % <sup>Oswiecimska et al., 1976; Oswiecimska y Bednarska, 1976</sup>.

En estudios recientes se menciona que esta especie contiene  $\beta$ -sitosterol **7** y ácidos grasos <sup>Aguirre-Hernández et al., 2007b</sup>, además de algunos flavonoides como canferol **8** y quercetina **9** <sup>Pérez-Ortega et al., 2008</sup>.

**Cuadro 2.** Algunos flavonoides aislados del género *Tilia*

	R	R1	R2	R3
Glucósido de quercetina o isoquercitrina <b>5</b>	O-Glc	H	OH	OH
3,7-diglucósido de quercetina <b>6</b>	O-Glc	O-Glc	OH	OH
Canferol <b>8</b>	OH	H	H	OH
Quercetina <b>9</b>	OH	H	OH	OH

#### 4.1.6.1.3. Aspectos farmacológicos

El extracto acuoso de las inflorescencias de *T. americana* colectada en diferentes zonas del Estado de Michoacán, al ser administrado vía oral a ratones suizos, potenció el efecto hipnótico inducido por barbitúricos y ejerció un efecto ansiolítico, efecto que fue evaluado en el LEC <sup>Pérez-Ortega et al., 2008</sup>. Asimismo, la administración intraperitoneal de diferentes dosis de los extractos hexánico (10, 30, 300 y 1000 mg/kg) y metanólico (10, 30 y 300 mg/kg) de las inflorescencias, producen los efectos sedante y ansiolítico en los modelos de hipnosis inducida con barbitúricos y en el LEC. En CA ambos extractos inducen también una importante disminución de la actividad motora espontánea. Otras especies del mismo género presentan actividad sobre el sistema nervioso. Por ejemplo, *Tilia europea* administrada a ratones a diferentes dosis (10 a 100 mg/kg) en la prueba de LEC indujo un aumento significativo en el tiempo de inmovilidad y una disminución en los estiramientos verticales, lo que sugiere un efecto sedante <sup>Coleta et al., 2001</sup>. Además, en el modelo de LEC, la administración intraperitoneal de una fracción de *T. tomentosa* provoca efectos ansiolíticos en los ratones <sup>Viola et al., 1994</sup>.

Cabe destacar que la dosis letal al 50 % (DL<sub>50</sub>) de *T. americana* fue de 2900 mg/kg y de 375 mg/kg para el extracto hexánico y metanólico, respectivamente <sup>Aguirre-Hernández et al., 2007a</sup>.

4.1.6.2. *Ocimum basilicum* L.

4.1.6.2.1. Aspectos etnobotánicos y usos

Científicamente, esta especie se clasifica como: Brands, 2000

Dominio: Eucarionte

Reino: Plantae

Subreino: Viridaeplantae

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Lamiidae

Superorden: Lamianae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Subfamilia: Nepetoideae

Tribu: Ocimeae

Género: ***Ocimum***

Especie: ***Ocimum basilicum*** Linn (Figura 2).



Figura 2. Fotografía de las partes aéreas de la planta *O. basilicum*. Foto: Alberto Ramos

A esta planta se le conoce con el nombre común de Albahaca, Albácar, Albácar hembra, Albácar macho, Albahaca blanca, Albahaca de castilla, Huuiki (mixe). Originaria de los países tropicales, es muy común en México. Es una hierba ramosa de 20 a 90 cm de altura, con hojas ovadas y enteras, las flores se disponen en largos ramilletes terminales, es aromática y perfumada. Es utilizada en la industria de los cosméticos, licores, perfumes y farmacia; también se usa como saborizante y aromatizante en salsas y guisos. Se le atribuyen propiedades medicinales, por lo que se usa como sudorífico, para las sofocaciones, los nervios, enfermedades respiratorias, infecciones bucales y dolor estomacal. Es habitual en ceremonias religiosas y con la parte aérea se elaboran ramos de "limpia" para desalojar un "mal" y para el "susto" <sup>Argueta, 1994b</sup>.

#### 4.1.6.3. Aspectos químicos

Una gran cantidad de especies del género *Ocimum* contienen concentraciones elevadas de flavonoides. Estos compuestos han sido asociados con la acción terapéutica que presentan algunas de estas especies. En un estudio de 111 especímenes de *O. americanum* colectados en diferentes regiones de Asia y África se identificaron los flavonoides **10-28**. La nevadensina (**21**) y la salvigenina (**26**) fueron las flavonas más frecuentes <sup>Vieira et al., 2003</sup> (Cuadro 3).

Especies del género *Ocimum* contienen 5-7-dihidroxi-6-metoxi-flavonas sustituidas en el anillo-B y 5,7-hidroxi-6,8-dimetoxi flavonas <sup>Tomas-Barberan, et al., 1990</sup>. Del extracto de éter de petróleo obtenido de las hojas de *O. basilicum* se aislaron el ácido *p*-cumarico **29** y esculetina **30** y de los extractos butanólico y de acetato de etilo, eriodictiol, eridictiol-7-glucósido y vicenina-2 <sup>Skaltsa and Philianos, 1986; Skaltsa and Philianos, 1990</sup> (Cuadro 4).

La especie *O. basilicum* contiene un porcentaje de 2.2-2.4 % de polifenoles totales, 0.6-10 % de flavonoides glucósilados, 0.4-0.44 % de ácido caféico **31** y 0.2-0.25% de flavonoides. La hidrólisis de flavonoides glicosilados genera principalmente canferol **8** y quercetina **9**; en menor proporción, se obtienen isoquercitrina **5**, rutina **32** y esculina **33**. Otros compuestos aislados de esta especie corresponden al ácido clorogénico **34** <sup>Hodisan, 1987</sup>.

El aceite esencial de *O. basilicum* contiene monoterpenos, fenilpropanos y sesquiterpenos entre ellos eugenol, metil eugenol, geraniol, linalool, metil-chavicol, ocimeno, eucaliptol, limoneno,  $\delta^3$ -careno,  $\alpha$ -pineno y 1-8-cineol <sup>Bull, 1980; Grayer *et al.*, 1996; Miele *et al.*, 2001</sup>. Otro constituyente del aceite esencial de esta planta es 1,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol que representan el 29.87 % de la composición <sup>Wang *et al.*, 2003; Di Cesare *et al.*, 2003</sup>.

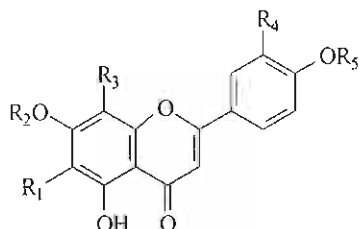
#### 4.1.6.4. Aspectos farmacológicos

Una de las principales actividades biológicas que se le han demostrado a *O.*

*basilicum* es la antioxidante <sup>Javasinghe *et al.*, 2003</sup>. También, se le ha demostrado efecto antiinflamatorio, siendo el eugenol el probable responsable de dicha actividad ya que inhibe la ciclooxigenasa y lipooxigenasa interfiriendo así el metabolismo del ácido araquidónico <sup>Kelm *et al.*, 2000; Singh, 1999</sup>. Esta sustancia demostró efecto hipotensor y cardiovascular en el modelo de ratas con hipertensión inducida con acetato de deoxicorticosterona <sup>Interaminense *et al.*, 2005</sup>.

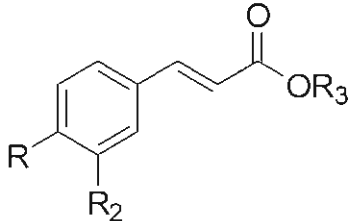
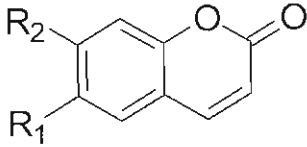
En lo que respecta a los efectos que tiene esta planta sobre el SNC no existen datos; sin embargo, se ha demostrado un efecto antidepresivo del extracto metanólico de las raíces de *O. sanctum* en el modelo de natación forzada en ratones <sup>Maitly *et al.*, 2000</sup>. Esta especie es capaz de ejercer efectos inmunomoduladores en animales estresados, probablemente, a través de un mecanismo mediado por el sistema GABAérgico <sup>Mediratta *et al.*, 2002</sup>, antecedente que indica que *O. basilicum* puede ejercer también un efecto depresor del SNC.

**Cuadro 3.** Estructura química de flavonas presentes en *Ocimum americanum*.



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Escutelareina <b>10</b>	OH	H	H	H	H
Luteolina <b>11</b>	H	H	H	OH	H
Cirsiliol <b>12</b>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	OH	H
Apigenina <b>13</b>	H	H	H	H	H
Pilosina <b>14</b>	OCH <sub>3</sub>	H	OH	H	CH <sub>3</sub>
Cirsimaritina <b>15</b>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H
Cirsilineol <b>16</b>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H
Ladaneina <b>17</b>	OH	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
5-desmetilsinensitina <b>18</b>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Xantomicrol <b>19</b>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H
8-hidroxisalvigenina <b>20</b>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	H	CH <sub>3</sub>
Nevadensina <b>21</b>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
Acacetina <b>22</b>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>
Pectolinarigenina <b>23</b>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	CH <sub>3</sub>
Genkwanina <b>24</b>	H	CH <sub>3</sub>	H	H	H
5-desmetilnobiletina <b>25</b>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Salvigenina <b>26</b>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
Gardenia B <b>27</b>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
7,4'-dimetil éter de apigenina <b>28</b>	H	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>

**Cuadro 4.** Estructura química de algunos compuestos del género *Ocimum*.

			
Ácidos fenil propanóicos			
	R	R2	R3
Ácido <i>p</i> -cumárico <b>29</b>	OH	H	
Ácido caféico <b>31</b>	OH	OH	
Ácido clorogénico <b>34</b>	OH	OH	Acido quínico
			
	R1		R2
Esculetina <b>30</b>	OH		OH
Esculina <b>33</b>	O-Glc		OH

Glc= glucosa



## 5. Justificación

Los trastornos de ansiedad se han convertido en un grave problema de salud pública por sus crecientes índices de incidencia, con un alto impacto social y grandes costos económicos. Este padecimiento se presenta en todos los segmentos poblacionales, pero es en la etapa productiva de los individuos donde causa los mayores efectos incapacitantes. La disminución de competencia física y laboral propicia una enorme carga económica y altos costos de salud pública por la erogación que representa, tanto en el tratamiento como en los servicios asistenciales que se requieren. Los tratamientos farmacológicos disponibles, si bien pueden ser efectivos en principio, a largo plazo ocasiona efectos secundarios indeseables, por lo tanto es indispensable la búsqueda de nuevos medicamentos. Por otra parte, en lo que respecta a la prevalencia la perspectiva a futuro es muy negativa por el incremento que se pronostica.

En México, el tratamiento institucional de mayor prescripción en estados de estrés y ansiedad, son las benzodiacepinas. En el IMSS el diazepam es el fármaco más recetado, a pesar de que causa un gran deterioro físico de los individuos tras un tratamiento por un periodo mayor a 4 meses (provocando tolerancia y dependencia). En el país, el mercado de medicamentos para combatir los problemas de estrés se estima en 200 millones de pesos al año [www.reforma.com/negocios/articulos/465/928530](http://www.reforma.com/negocios/articulos/465/928530). Una perspectiva hacia el 2015 indica que alrededor de 54.3 millones de personas requerirán terapia con ansiolíticos. Estudios de mercado realizados por el CIBIS-IMSS establecen que el 1.4 % de pacientes con trastornos de ansiedad utilizarán fitomedicamentos, cifra que puede incrementarse al contar con ansiolíticos efectivos que presenten menos efectos indeseables, lo que implica mayor apego al tratamiento Herrera-Arellano, 2007. Por lo anterior se puede proyectar que habrá una demanda de hasta 1 millón de tratamientos con fitomedicamentos ansiolíticos (Comunicación personal Dr. Jiménez-Ferrer). Se ha demostrado que algunos compuestos de origen vegetal como los flavonoides, muestran capacidad ansiolítica en algunos modelos biológicos además de unirse *in vitro* a los receptores GABA<sub>A</sub>. *Tilia americana* tiene un alto contenido de flavonoides, los cuales pueden tener actividad ansiolítica sin modificar de manera importante otros parámetros conductuales, por lo que el estudio de esta planta significa una propuesta terapéutica importante en el tratamiento de la ansiedad.

## 6. Hipótesis

Con base en el uso etnomédico las especies vegetales *T. americana* var. *mexicana* y *O. basilicum*, poseen metabolitos secundarios con actividad ansiolítica sin modificar la actividad motora espontánea.

## 7. Objetivos

### 7.1. General

Evaluar el efecto ansiolítico y sobre la actividad motora espontánea que producen los extractos de diferente polaridad, fracciones y principios activos de las especies *T. americana* y *O. basilicum*, en los modelos de laberinto elevado en forma de cruz y campo abierto.

### 7.2. Particulares

Evaluar la actividad ansiolítica de los extractos, fracciones y compuestos de las especies *T. americana* y *O. basilicum* en el modelo de LEC.

Evaluar el efecto que producen los extractos, fracciones y compuestos de *T. americana* y *O. basilicum* sobre la actividad motora espontánea en el modelo de CA.

Aislar e identificar mediante un análisis comparativo de cromatografía líquida de alta resolución, al menos un compuesto presente en la fracción activa de la especie seleccionada.

## 8. Material y reactivos

### 8.1. Material biológico

#### 8.1.1. *Tilia americana*

El material vegetal consistió de brácteas y flores de *T. americana* y fue colectado en los meses de junio y julio del año 2006 en la localidad de Mexicapan, Municipio de Ocuilán, en el Estado de México. Un ejemplar de herbario fue identificado por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras, directora del Herbario IMSS, ubicado en el Centro Médico Nacional Siglo XXI y se registró para posterior referencia con el número de especimen 15 099 con el nombre científico de *Tilia americana* var. *mexicana* (Schltdl.) Hardin.

#### 8.1.2. *Ocimum basilicum*

*O. basilicum* fue obtenido por cultivo en los invernaderos del Centro de Investigación Biomédica del Sur. La semilla de albahaca fue comprada con un proveedor de semillas, "Rancho los Molinos" ubicado en Km 16.5, carretera Cuernavaca-Tepoztlán, Morelos. Se mantuvo bajo condiciones especificada por el productor hasta el momento de su germinación. Las semillas se sembraron en una mezcla de arcilla y sustrato (Peet Mos R) 50:50. Posteriormente, las plantas fueron sembradas en almácigos y, en estado de plántula, fueron trasplantadas a bolsas de cultivo. Después de 3 meses de crecimiento, las hojas frescas fueron cosechadas para la preparación de un extracto acuoso en fresco y otra parte se secó para la preparación de un extracto hidroalcohólico. El ejemplar de referencia se encuentra depositado en el Herbario IMSS, con el número 10873.

#### 8.1.3. Animales de experimentación

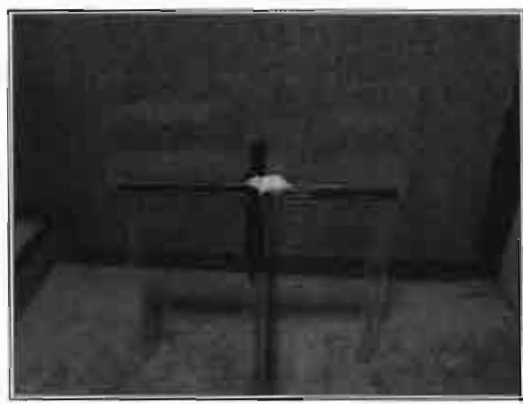
En el estudio se utilizaron ratones albinos de la cepa ICR obtenidos de Harlan, México, D.F. Los machos (con 35 g en promedio) fueron asignados a las pruebas de ansiedad en el laberinto elevado en forma de cruz (LEC) y de actividad motora en campo abierto (CA). Hembras (30 g en promedio) fueron utilizadas para evaluar el posible efecto tóxico del extracto activo. El manejo de los animales de experimentación se llevó a cabo siguiendo la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999

(especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio). Todos los roedores fueron acondicionados por lo menos dos semanas antes de la experimentación en un laboratorio a una temperatura de 25 °C, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 por 12 horas, con acceso libre al agua y al alimento. Durante la experimentación, los ratones fueron trasladados del laboratorio de acondicionamiento a un laboratorio sono-amortiguado, a una temperatura de 25 °C y con luz roja.

## 8.2. Material para las pruebas biológicas y químicas

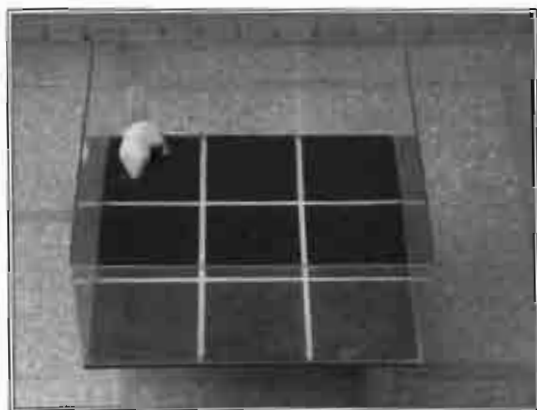
### 8.2.1. Material para la prueba de LEC y CA

El equipo empleado en la prueba de actividad ansiolítica fue un laberinto en forma de cruz, de acrílico, con el centro de 5 X 5 cm, los brazos abiertos y cerrados de 30 cm de largo X 5 cm de ancho; la altura de las paredes de los brazos cerrados de 15 cm (Figura 3).



**Figura 3.** Fotografía que muestra el equipo utilizado en el modelo de LEC.

Para el ensayo de campo abierto se utilizó un equipo fabricado de acrílico con paredes transparentes y piso negro (30 cm X 30 cm X 15 cm) dividido en 9 cuadrados de igual área (Figura 4).



**Figura 4.** Fotografía que muestra el equipo utilizado en el modelo de CA.

## 9. Métodos

### 9.1. Diseño experimental

En el estudio se consideraron diseños experimentales para abordar los aspectos químicos y farmacológicos. Asimismo, se consideró la determinación de la toxicidad aguda del material vegetal (Anexo I).

Para el análisis farmacológico se utilizaron dos pruebas, la de ansiedad (LEC) y actividad motora (CA). Los diferentes grupos de animales evaluados recibieron los tratamientos de *T. americana* (Cuadro 5) y de *O. basilicum* (Cuadro 6) por la vía oral (vo), administrando los productos 1 hora antes de cada ensayo. En el caso de los compuestos puros, se consideró también la administración intraperitoneal (ip) 30 minutos antes de las pruebas.

Todos los tratamientos se disolvieron en una solución de Tween 20 al 1 % (TW 1 %), solución que fue administrada también al grupo control negativo. Los compuestos aislados de *T. americana* tuvieron una mayor solubilidad en Carboximetilcelulosa al 1 % (CMC 1 %), razón por la cual se incluyó un segundo control negativo con CMC.

**Cuadro 5.** Dosis y vía de administración de los diferentes tratamientos utilizados en la evaluación de *T. americana*

<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis</b>	<b>Vía de administración</b>
Extractos Hex, AcOEt, MeOH e Hidroalcohólico (HA)	100 mg/kg	Oral
Extracto MeOH	3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 mg/kg	Oral
Fracciones F1, F2, F3 y F4	100 mg/kg	Oral
Fracción F1	12.5, 100 y 200 mg/kg	Oral
Fracciones F1A, F1B, F1C y F1D	50 mg/kg	Oral
Tilirósido	30 y 60 mg/kg	Intraperitoneal
	60 y 200 mg/kg	Oral
F'15	60 mg/kg	Intraperitoneal
	100 y 200 mg/kg	Oral
Diacepam (DZP)	1.0 mg/kg	Intraperitoneal
Tween 20 1 % (Tw 1 %)	100 µl/10 g de peso de ratón	Oral
Carboximetilcelulosa 1 % (CMC 1 %)	100 µl/10 g de peso de ratón	Oral

**Cuadro 6.** Dosis y vía de administración de los diferentes tratamientos utilizados en la evaluación de *O. Basilicum*

<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis</b>	<b>Vía de administración</b>
Extracto HA	12.5, 25 y 50 mg/kg	Oral
Bipartición AcOEt (FAcOEt) con agua (Fac)	100 mg/kg	Oral
Extracto acuoso de hoja fresca (Ef)	100 mg/kg	Oral

### 9.2. Prueba de la actividad ansiolítica en el LEC

Los animales se colocaron en el centro de LEC y se registraron los siguientes parámetros en el transcurso de 5 minutos.

Ta: tiempo de permanencia en brazos abiertos (s)

Tc: tiempo de permanencia en brazos cerrados (s)

Na: número de cruces hacia los brazos abiertos

Nc: número de cruces hacia los brazos cerrados

El efecto relativo se expresó como porcentaje aplicando las siguientes ecuaciones:

$$\%Na = \frac{Na}{Na + Nc} \times 100$$

$$\%Ta = \frac{Ta}{Ta + Tc} \times 100$$

Donde:

%Ta: Porcentaje del tiempo de permanencia en brazos abiertos

%Na: Porcentaje del número de cruces a brazos abiertos

### 9.3. Prueba de la actividad motora espontánea en CA

El ratón se colocó en el centro del aparato de CA para determinar su patrón conductual durante 5 minutos con base en la actividad exploratoria que muestra el animal sometido a los diferentes tratamientos <sup>Archer, 1973</sup>. El número de cruces totales que los ratones realizan en el campo (suma de cruces en la periferia y en el centro del campo, CT) se registra cuando las cuatro patas de los ratones estén completamente dentro del cuadro. El otro parámetro que se midió fue el número de estiramientos verticales (EV).

## 9.4. Análisis, evaluación y preparación química

### 9.4.1. Método de análisis por HPLC

El método que se aplicó en el estudio de las muestras fue diseñado para la detección de flavonoides, sustancias que se distribuyen ampliamente en diferentes especies del género *Tilia* y que presentan actividad importante sobre SNC <sup>Toker, 2004</sup>.

Las muestras provenientes de *T. americana* se redisolviéron en metanol grado HPLC (4 mg/mL) y se inyectaron en un volumen de 20 µl para su análisis en HPLC. El equipo utilizado fue un cromatógrafo líquido de alta precisión Waters 996 con bombas binarias y controlado por medio de un programa Millenium, acoplado a un detector de arreglo de diodos Waters 2595, con un rango de detección de 190 a 600 nm. En el estudio se utilizó una columna de fase reversa (Alltima HP C18 HL) con un tamaño de partículas de 3 µm. La elución por gradiente se llevó a cabo manteniendo un flujo constante de 1.0 ml/min con acetonitrilo (A) y agua (B) bajo el siguiente esquema: 15 % de A por 4 min, el gradiente de elución se incrementó gradualmente hasta 55 % de A en 1.0 min y se mantuvo con este gradiente por 4 min; posteriormente, se incrementó a 70 % de A en 2 min y a 85 % en los 3 minutos siguientes para regresar a las condiciones iniciales (15 % A) en 2 minutos. El eluato se monitoreó a una longitud de onda de 250 nm.

La valoración de las muestras de *T. americana* se llevó a cabo por medio del análisis comparativo con diferentes flavonoides comerciales (Sigma, USA): apigenina (95 %), crisina (97 %), canferol (90 %), quercetina (95 %), quercitrina (85 %), rutina (95 %), hesperetina (95 %), hesperidina (80 %), naringina ( $\geq 90$ ), naringenina (95 %), neohesperidina (90 %) y una muestra del tilirósido aislado en forma pura de la planta (10.4.2.1.3).

Debido a que *O. basilicum* sólo presentó actividad con el extracto hidroalcohólico, no se llevó a cabo un seguimiento fitoquímico de la especie.

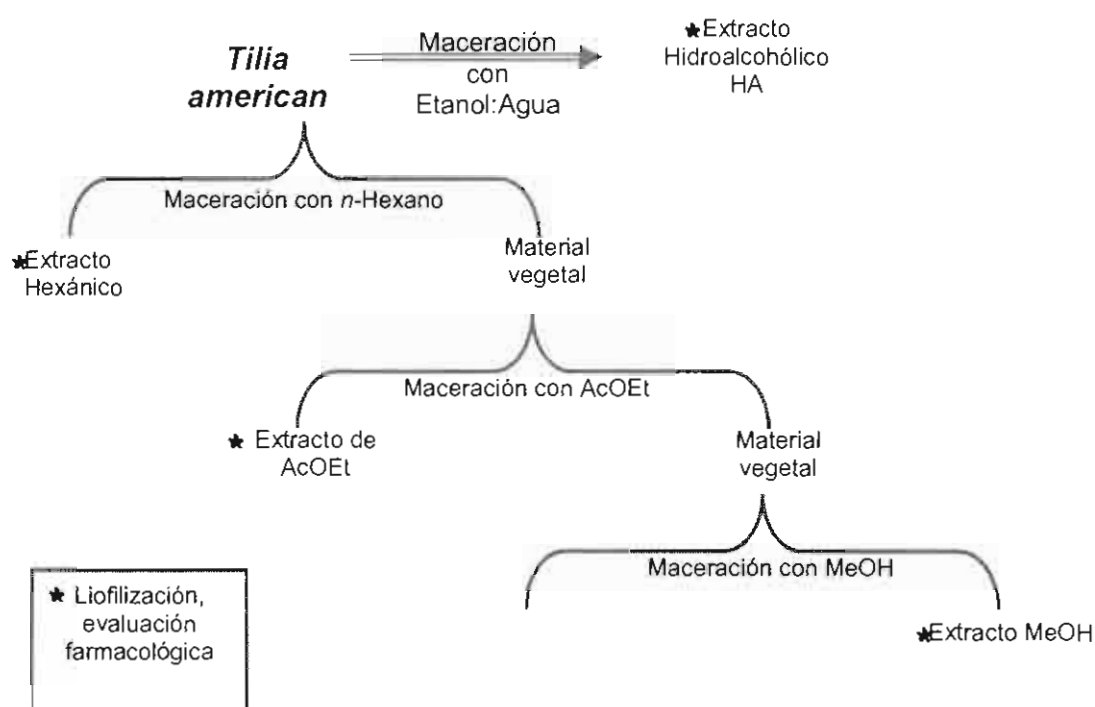


## 9.4.2. Obtención de los extractos, fracciones y compuestos

### 9.4.2.1. Extractos de *T. americana* de diferente polaridad

Las brácteas y flores secas y molidas de *Tilia americana* (2 kg) se maceraron a temperatura ambiente con 6 litros de *n*-Hexano por 3 veces. De manera secuencial se maceró el material vegetal residual con 6 litros de AcOEt por 3 veces repitiendo el proceso con 6 litros de metanol por 3 veces (Diagrama 1).

Por otra parte, se utilizaron 400 g de planta molida para preparar un infusión hidroalcohólica al 60 % (EtOH-H<sub>2</sub>O 60:40).



**Diagrama 1.** Procedimiento que se utilizó para la obtención de extractos de diferente polaridad obtenidos de *T. americana*.

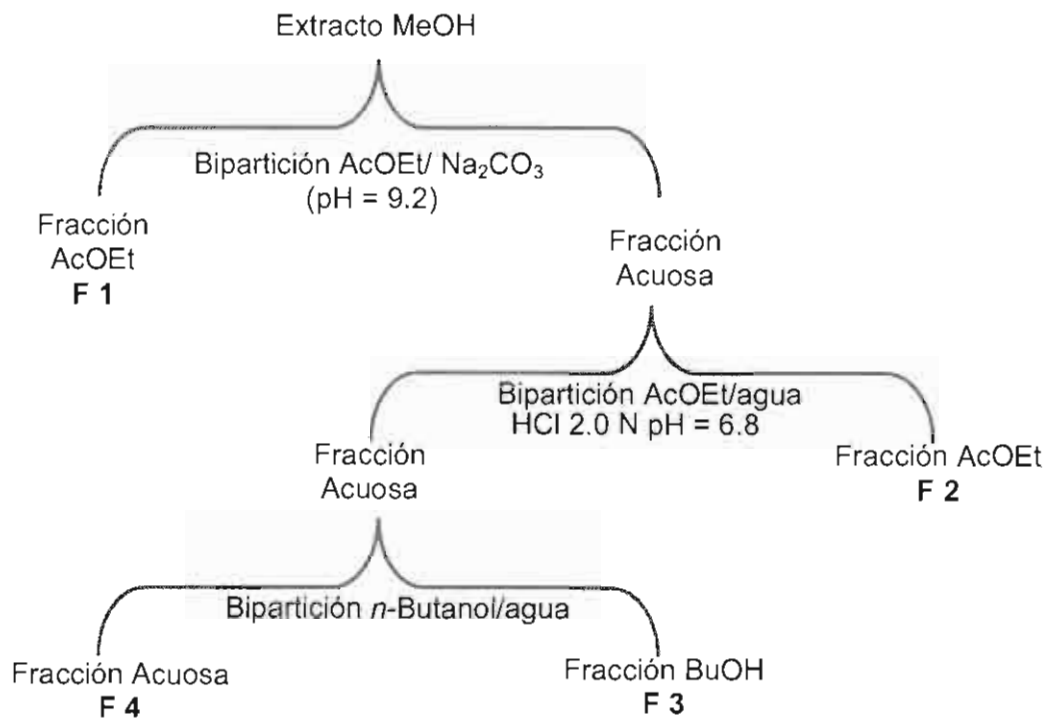
#### 9.4.2.1.1. Fraccionamiento del extracto MeOH por bipartición entre fases

Debido a que el extracto MeOH presentó la mayor actividad ansiolítica, fue seleccionado para el estudio químico. Se realizó un proceso de separación para la extracción selectiva de los flavonoides de acuerdo a su polaridad.

El extracto MeOH (250 g) fue sometido a un proceso de separación entre fases con AcOEt y una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH= 9.22 y se obtuvo la fracción orgánica F1. La fracción acuosa neutralizada con una solución HCl 2.0 N hasta un pH =6.8 se biparticionó con AcOEt para obtener la fase orgánica F2. La fracción acuosa residual fue sometida al mismo proceso de extracción líquido-líquido con *n*-Butanol y se obtuvieron las fracciones orgánica F3 y acuosa F4 respectivamente (Diagrama 2). Todas las fracciones se concentraron a sequedad, eliminando completamente el disolvente con alto vacío. Las muestras obtenidas se almacenaron en recipientes color ambar a 4 °C, para su utilización en la prueba de LEC y CA.

#### 9.4.2.1.2. Fraccionamiento de F1

La fracción F1 fue la de mayor actividad ansiolítica, por lo que se le dió un tratamiento con disolventes orgánicos (Diagrama 3). F1 se precipitó con *n*-hexano, la parte soluble se denominó F1A. El precipitado fue resuspendido en  $\text{CHCl}_3$  para obtener F1B y una insoluble que se suspendió con una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (9:1), dando F1C y la mezcla más polar (F1D). Todas las fracciones fueron concentradas y secadas al alto vacío y almacenadas a 4 °C, hasta probarlas en los ensayos farmacológicos.



**Diagrama 2.** Procedimiento para la obtención de fracciones de diferente polaridad a partir del extracto MeOH activo de *T. americana*.

#### 9.4.2.1.3. Purificación de la fracción F1C

Siendo F1C la fracción más activa, se procedió a realizar una separación cromatográfica en columna abierta (1.5 cm de diámetro por 28 cm de altura) utilizando sílica gel fase reversa y un sistema de gradiente iniciando con una mezcla de acetonitrilo:agua (60:40) para la elución. Se colectaron muestras de 500  $\mu$ L cada una, para su reagrupación posterior con base en su similitud en cromatografía en capa fina (CCF). El acetonitrilo se incrementó gradualmente hasta 100 %. Las muestras se combinaron para dar 4 fracciones con polaridad decreciente: F1C<sub>1</sub>, F1C<sub>2</sub>, F1C<sub>3</sub> y F1C<sub>4</sub> (Diagrama 4).

De la fracción F1C<sub>3</sub> precipitó un compuesto color amarillo, que por medio del análisis por RMN, se determinó un compuesto flavonoide ya conocido, el tilirósido (Anexo II). El tilirósido resultó ser el componente más abundante en la muestra F1C. Asimismo, el análisis por HPLC de la fracción F1C mostró señales que, por comparación con estándares de referencia (Cuadro 8), correspondieron a la de los flavonoides quercetina, quercitrina, rutina y canferol.

#### 9.4.2.1.4. Obtención de flavonoides puros para las pruebas biológicas (Tilirósido y F'15)

Con la finalidad de obtener cantidad suficiente del compuesto identificado como Tilirósido, se pesaron 8 gramos de la fracción F1 que fueron adsorbidos con 20 g de sílica gel fina (230  $\mu$ m), se secaron y colocaron en una columna de vidrio, previamente preparada con 200 g de sílica gel.

El sistema de elución utilizado fue CHCl<sub>3</sub>:MeOH. Con un gradiente inicial de 85:15 se colectaron 19 fracciones de 150 ml (F'1 a F'19). Después, se incrementó la polaridad del disolvente a 80:20 con el cual se colectaron las fracciones F'20 a F'31 de 150 ml cada una.

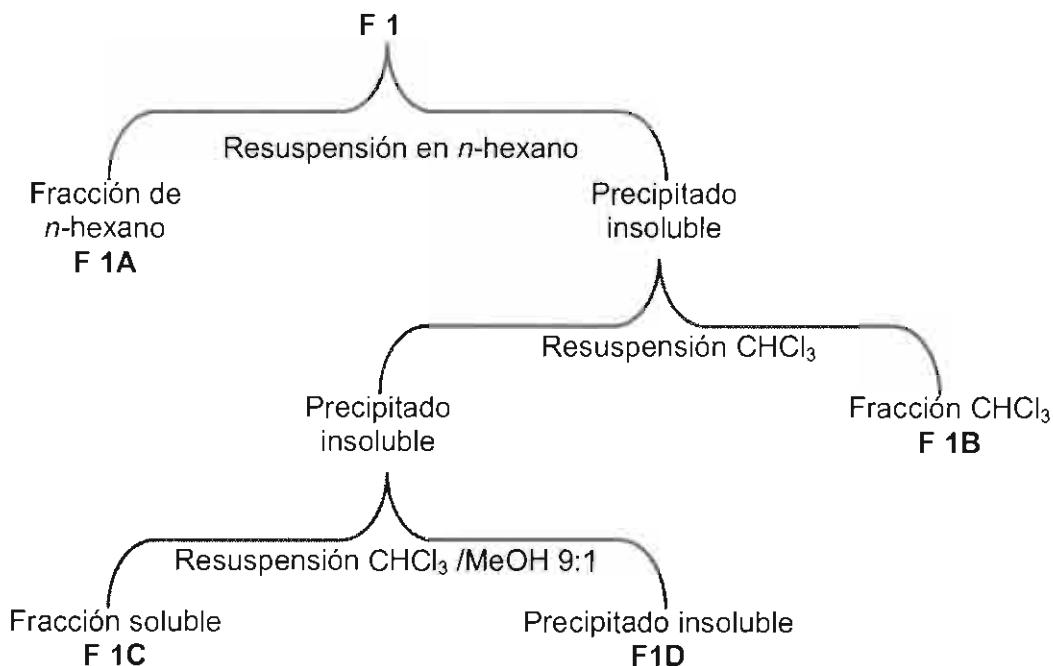
Cada colecta fue monitoreada utilizando cromatografía en capa fina (CCF) lo que permitió reunir mezclas con base en su perfil cromatográfico. Para esta técnica se utilizaron cromatoplasmas de sílica gel en fase normal, los sistemas de elución fueron:

- a) CHCl<sub>3</sub>:MeOH:CH<sub>3</sub>CN:TFA al 0.5% en agua (6.5:2:1:0.5), para las fracciones más polares.

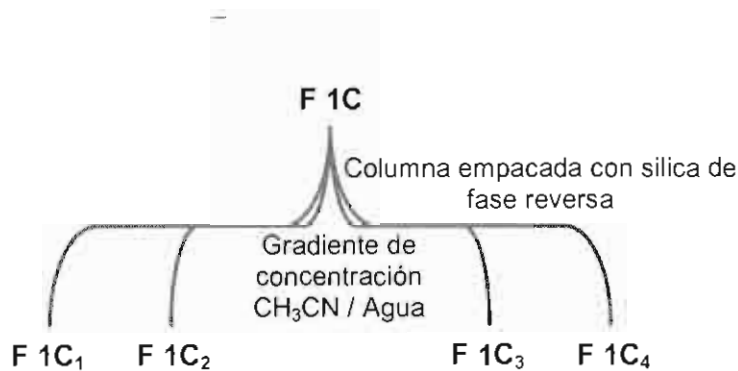
b)  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{CH}_3\text{CN}:\text{TFA}$  al 0.5% en agua (7:2:1:0.5), para las fracciones medianamente polares.

c)  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{CH}_3\text{CN}$  (7:2:1), para las fracciones poco polares.

Todas las placas fueron reveladas con 2-aminoetil difenilborinato, de estas reuniones, la más abundante fue la F'9-F'10, identificada posteriormente como Tilirósido y la F'15 (compuesto aún no identificado). Ambos fueron evaluados en los ensayos biológicos (Cuadro 5) y enviados al Centro de Investigaciones Químicas (UAEM) para su elucidación estructural por Resonancia Magnética Nuclear.



**Diagrama 3.** Procedimiento utilizado para la obtención de la fracción F1.



**Diagrama 4.** Procedimiento para la separación cromatográfica de F1C en columna abierta.

#### 9.4.2.2. Extracto HA de *O. basilicum*

Las hojas frescas de albahaca fueron colocadas en camas de malla en un cuarto oscuro para su deshidratación. Posteriormente, 2 kg de hoja seca de *O. basilicum* fueron colocadas en un recipiente de 25 L para su maceración en una solución de etanol-agua (60:40) a temperatura ambiente, por tres veces. Después, el volumen fue reducido en un evaporador rotatorio y posteriormente concentrado al alto vacío. El extracto hidroalcohólico así obtenido fue almacenado a 4 °C, para su posterior uso en las pruebas biológicas.

##### 9.4.2.2.1. Bipartición del extracto HA

Dos gramos del extracto hidroalcohólico de *O. basilicum* se sometieron a una bipartición con 50 ml de agua más 50 ml de AcOEt con la finalidad de obtener 2 fracciones de polaridades extremas. Después de tres lavados, la fracción orgánica (FAcOEt) y acuosa (Fac) fueron separadas y concentradas en un evaporador rotatorio, posteriormente se eliminó completamente el disolvente al alto vacío hasta obtener un polvo y se almacenaron para su utilización en las pruebas biológicas.

#### 9.4.2.2.2. Extracto de hoja fresca

Hojas frescas de *O. basilicum* (41.5 g) se molieron en una licuadora, el material obtenido se filtró a través de una gasa y el jugo fue centrifugado a 3000 rpm/15 min. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a 4 °C, para su uso posterior.

#### 9.5. Análisis estadístico

El análisis de los datos generados en cada etapa experimental se llevó a cabo aplicando el Análisis de varianza de una vía (ANOVA) que permitió determinar, en cada ensayo, diferencias significativas entre las medias poblacionales de cada grupo, calculando el valor de Fischer (calculado por  $F = \text{gl entre grupos} / \text{gl dentro de grupos}$ , donde gl son los grados de libertad) con un nivel de confianza del 95 %, seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. En la sección de resultados se reporta el valor de  $F$  sólo para aquellos grupos que mostraron diferencias. El programa estadístico utilizado fue el spss versión 11.

## 10. Resultados

### 10.1. Análisis químico de *T. americana*

En el cuadro 7 se muestran los rendimientos de los productos obtenidos en los procesos de extracción y fraccionamiento químico de la planta, así como de los flavonoides tilirósido y el compuesto F'15 (aún no se ha elucidado la estructura). El análisis comparativo por medio de HPLC con algunos estándares comerciales permitió determinar los flavonoides contenidos en el extracto metanólico y en las fracciones F1 y F1C. Todas las comparaciones se realizaron a una longitud de onda de 254 nm. En el cuadro 8 se muestran las diferentes longitudes de absorción máxima de los compuestos de referencia así como del tilirósido.

El extracto metanólico (Cuadro 9), la fracción F1 (Cuadro 10) y la fracción F1C (Cuadro 11) contienen los flavonoides rutina **32**, canferol **8**, quercetina **9**, quercitrina **35** y tilirósido **36**, este último compuesto en una mayor concentración. En el cromatograma se detectaron además otras señales con tiempos de retención y espectros de absorción de UV que no corresponden con los de los compuestos de referencia utilizados.




**Cuadro 7.** . Rendimientos de los extractos y fracciones de *T. americana*

Disolvente	Cantidad procesada	Cantidad obtenida (g)	Rendimiento (%)
<i>n</i> -Hex	6000 g de bráctea molida	52.8	0.88
AcOEt		33.0	0.55
MeOH		292.2	4.87
HA	400 g de bráctea molida	59.32	14.8
F1	250 g de extracto MeOH	8.0	3.2
F2		4.0	1.6
F3		7.5	3.0
F4		8.0	3.2
F1A			ND
F1B			ND
F1C			ND
F1D			ND
F1C1	8 g de F1	0.762	9.5
F1C2		0.268	3.3
F1C3 (F15)*		0.503	6.2
F1C4			
F1C4p**(Tilirósido)		0.500	6.25

\* Precipitado café aún no identificado estructuralmente y \*\* precipitado amarillo que corresponde a tilirósido, ambos compuestos se aislaron de F1C. ND: no determinado



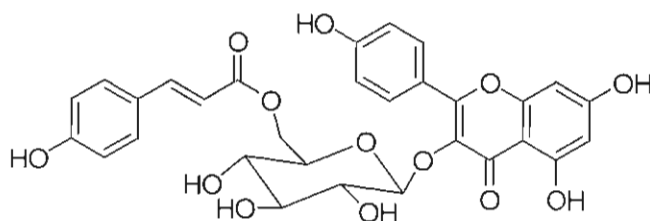
**Cuadro 8. Estructura química de flavonoides comerciales utilizados como estándares**

		R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	RT	λ <sub>máx</sub>						
 Flavonoles		 Flavanonas		 Flavonas									
<b>Flavonoles</b>													
Canferol <b>8</b>		OH	H	OH	H	7.00	197	266	364				
Quercetina <b>9</b>		OH	H	OH	OH	6.58	202	255	368				
Quercitrina <b>35</b>		O-Rha	H	OH	OH	5.54	204	255	349				
Rutina <b>32</b>		O-Glu-ram	H	OH	OH	5.10	205	256	357				
<b>Flavanonas</b>													
Hesperetina <b>37</b>			H	OH	OCH <sub>3</sub>	7.20	201	287					
Hesperidina <b>38</b>			Glc-Rha <sup>6</sup>	OH	OCH <sub>3</sub>	5.52	201	284					
Naringina <b>39</b>			Glu-Ram	H	OH	5.46	174	282					
Naringenina <b>40</b>			H	H	OH	7.01	195	282					
Neohesperidina <b>41</b>			Glu-Ram <sup>2</sup>	OH	OCH <sub>3</sub>	5.58	205	284					
<b>Flavonas</b>													
Apigenina <b>13</b>			H	OH	H	6.94	199	267	334				
Crisina <b>42</b>			H	H	H	9.08	205	268	312				

Ram= ramnosa

Glu=glucosa

Tilirósido **36**



**36**

**Cuadro 9.** Análisis por HPLC del extracto MeOH de *T. americana*

Extracto Metanólico de <i>T. americana</i>				
RT	$\lambda$ máx		Compuesto	
1.26	221	279		
1.78	201	276		
5.01	204	256	356	Rutina <b>32</b>
5.20	201	258	354	
5.43	195	266	350	Quercitrina <b>35</b>
6.11	193	267	313	Tilirósido <b>36</b>
6.53	195	255	368	Quercetina <b>9</b>
7.08	195	265	368	Canferol <b>8</b>

Intensidad de las señales en el cromatograma: 1.26 > 1.78 = 6.1 > 5.2 > 5.4 > 6.53 = 7.08 = 5.01 (correspondiente a Tilirósido > Quercitrina > Quercetina > Canferol y Rutina)

**Cuadro 10.** Análisis por HPLC de la fracción F1 *T. americana*

Fracción FA de <i>T. americana</i>				
RT	$\lambda$ máx		Compuesto	
1.26	221	279		
1.84	198	267		
3.31	205	273		
5.30	202	279		
5.50	209	256	358	
5.54	211	254	349	Quercitrina <b>35</b>
5.81	198	265	320	
6.15	194	267	313	Tilirósido <b>36</b>
6.24	192	266	312	Isómero de Tilirósido
6.48	192	234	288	Quercetina <b>9</b>
7.11	197	268	368	Canferol <b>8</b>

Intensidad de las señales en el cromatograma: 6.15 > 6.2 = 3.3 = 1.26 > 1.84 = 5.5 = 5.54 > 5.8 = 5.3 (correspondiente a Tilirósido > Quercitrina > Quercetina >>> Canferol)

**Cuadro 11.** Análisis por HPLC de la fracción F1C *T. americana*

Fracción F1C de <i>T. americana</i>				
RT	$\lambda$ máx		Compuesto	
1.83	197	269		
3.25	205	263		
5.12	200	267	352	Rutina <b>32</b>
5.29	208	255	355	
2.48	208	265	352	
5.54	208	254	350	Quercitrina <b>35</b>
6.13	204	265	331	Tilirósido <b>36</b>
6.55	201	257	367	Quercetina <b>9</b>
7.08	195	268	368	canferol <b>8</b>

Intensidad de las señales en el cromatograma: 6.13 > 5.4 = 5.54 = 5.29 > 3.25 > 1.83 = 1.24 >> 5.12 = 6.55 = 7.08 (correspondiente a Tilirósido > Quercitrina >>> Quercetina, Canferol y rutina)

## 10.2. Evaluación Biológica

La significancia estadística en todos los estudios se estableció respecto a los grupos de animales que recibieron el vehículo (control negativo), con un nivel de  $p < 0.05$  (en las figuras se muestra aquellos grupos que fueron estadísticamente diferentes). El vehículo utilizado en los estudios fue una solución Tween 20 al 1% y solución al 1 % de carboximetilcelulosa (CMC) en la evaluación de los efectos del Tilirósido.

Los productos se administraron vía oral y, en el caso del Tilirósido, se realizaron observaciones por vía oral e intraperitoneal. El DZP utilizado en el estudio como control positivo se administró ip en una dosis de 1 mg/kg.

En la prueba de campo abierto, ninguno de los tratamientos administrados provocó alteraciones en la actividad motora espontánea, por lo que no se observaron cambios estadísticamente significativos en comparación con los grupos utilizados como control negativo (Figura 16, Cuadros 14, 16, 18, 20, 23 y 26).

La administración ip del DZP utilizado como control positivo en el LEC, indujo un aumento significativo de % Ta y de % Na (Cuadros 12, 13, 15, 17, 19, 22).

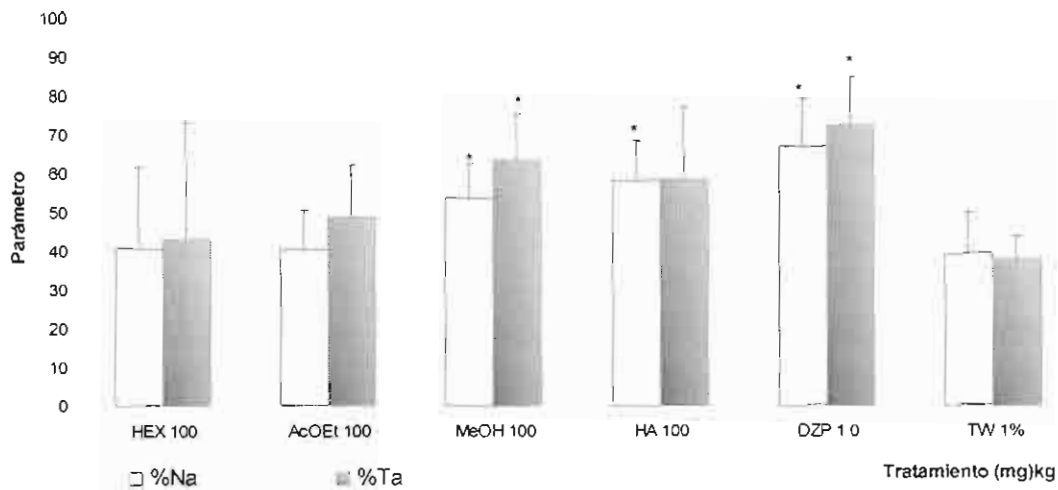
## 10.3. Extractos de *T. americana*

La administración de los extractos hexánico y AcOEt a una dosis de 100 mg/kg no indujeron cambios significativos en los parámetros % Ta y % Na ( $p > 0.05$ , Cuadro 12). El extracto hidroalcohólico (HA) provocó un aumento de ambos parámetros, sin embargo, sólo se observó diferencia significativa para el % Na ( $p < 0.05$ ). En cambio, el extracto MeOH en dosis de 100 mg/kg incrementó significativamente tanto el % Ta como el % Na ( $p < 0.05$ ) y los parámetros no fueron significativamente diferentes a los del grupo tratado con diacepam (Figura 5, Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Evaluación de los extractos de *T. americana* en LEC

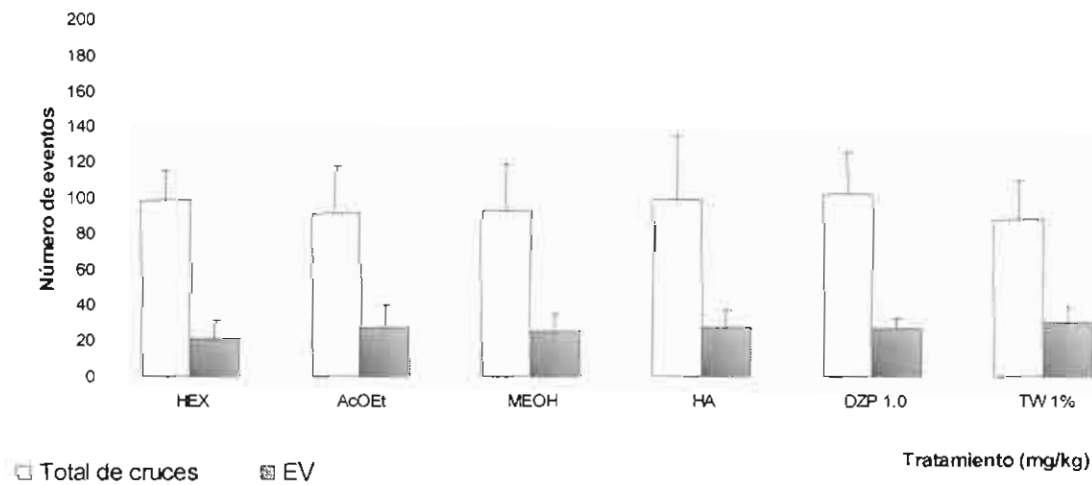
P	Tx	Tw 1 %	DZP 1 mg/kg	100 mg/kg			F(tablas) < F calculada	
				Hex	AcOEt	MeOH		
% Ta		37 ±10	72 ±12*	41 ±21	40 ±10	63 ±12*	58 ±18*	F (2.53) < 3.49
% Na		39 ±10	67 ±12*	43 ±31	AcOEt 48	53 ±12*	58 ±10	F (2.53) < 5.51

ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ . Promedio ± DE (desviación estándar)



**Fig. 5.** Porcentaje de entradas y de tiempo de permanencia en LEC, con la administración de 100 mg/kg de extractos de *T. americana*. (HEX= hexánico, AcOEt= acetato de etilo, MeOH= metanólico, HA= hidroalcohólico), DZP= Diacepam y TW= solución Tween 20 al 1%, % Na= porcentaje del número de cruces en brazos abiertos, % Ta= porcentaje de tiempo en brazos abiertos. ANOVA, post-prueba Bonferroni \* $p < 0.05$ .

ANA  
 ARCHIVO HISTÓRICO  
 SERVICIOS DE INFORMACIÓN



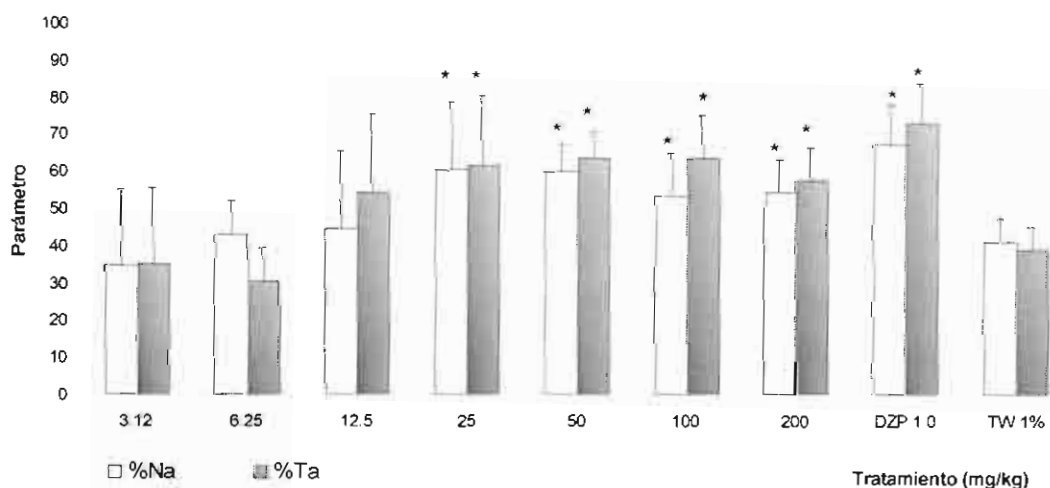
**Fig. 6.** Número total de cruces y el número de levantamientos verticales que realizan los ratones en CA, con la administración de 100 mg/kg de extractos de *T. americana*. (HEX= hexánico, AcOEt= acetato de etilo, MeOH= metanólico, HA= hidroalcohólico), DZP= Diacepam, TW= solución Tween 20 al 1%, EV= estiramientos verticales, ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ .

El incremento significativo del % Na y de % Ta en el LEC se observó con dosis del extracto MeOH entre 25 y 200 mg/kg; dosis menores a 25 mg/kg no tuvieron efecto sobre estos parámetros (Cuadro 13, Figura 7).

**Cuadro 13.** Evaluación de diferentes dosis del extracto MeOH en LEC

P	Tx	Tw 1 %	DZP 1 mg/kg	MeOH (mg/kg)				F(tablas) < F calculada
				25	50	100	200	
% Ta		39 ±6	73 ±11*	61 ±19*	63 ±7*	63 ±12*	58 ±10*	F(2.10) < 5.12
% Na		41 ±21	67 ±11*	60 ±18*	60 ±6*	53 ±12*	57 ±9*	F(2.10) < 10.11

ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ . Promedio ± DE (desviación estándar)



**Fig.7.** Porcentaje de entradas y de tiempo de permanencia en LEC, con la administración de diferentes dosis del extracto metanólico. DZP= Diacepam, TW= solución Tween 20 al 1%, % Na= porcentaje del número de cruces en brazos abiertos, % Ta= porcentaje de tiempo en brazos abiertos. ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ .

**Cuadro 14.** Extracto MeOH sobre parámetros de actividad motora.

Tratamiento (mg/kg)	Cruces totales	Estiramientos verticales
MeOH (3.12)	97.5 ±22.6	33.5 ±15.1
MeOH (6.25)	94.3 ±30.6	33.6 ±17.5
MeOH (12.5)	76.3 ±21.6	26.5 ± 9.6
MeOH (25)	103.7 ±17.2	50.8 ± 9.1
MeOH (50)	109.3 ±17.9	53.8 ± 7.4
MeOH (100)	94.7 ±25.6	29.5 ±15.1
MeOH (200)	104.4 ±24.1	48.0 ±14.5
DZP (1.0)	100.1 ±21.9	29.0 ± 8.0
TW 1% (100 µl/10 g)	95.3 ±20.1	39.6 ±16.1

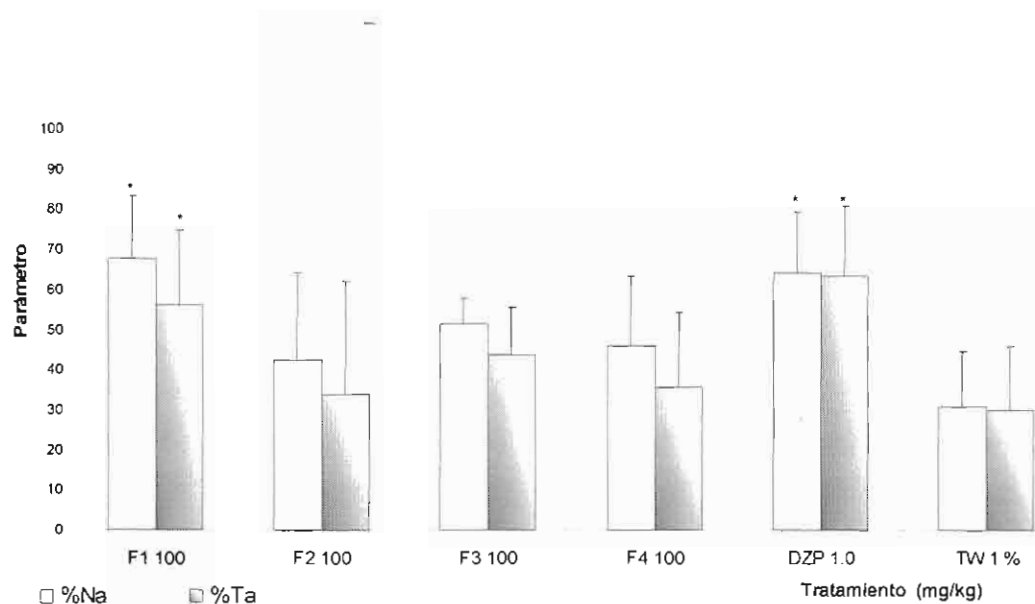
#### 10.4. Fracciones F1, F2, F3 y F4

La actividad de las fracciones F1, F2, F3 y F4 obtenidas a partir del extracto MeOH se muestra en el Cuadro 15 y la figura 8. Sólo la fracción F1 presentó un incremento estadísticamente significativo en los parámetros % Na y % Ta en LEC ( $p < 0.05$ ), para el resto de las fracciones, la diferencia determinada no fue significativa ( $p > 0.05$ ). Comparado estos parámetros con los del grupo tratado con diacepam (1mg/ml ip), cabe señalar que los extractos mostraron igual comportamiento que dicho agente ansiolítico (Cuadro15).

**Cuadro 15.** Evaluación de F1, F2, F3 y F4 en el LEC

P	Tx	Tw 1 %	DZP 1 mg/kg	F1	F2	F3	F4	F(tablas) < F calculada
				100 mg/kg				
% Ta		31 ±14	64 ±18*	56 ±19*	34 ±28	44 ±12	36 ±19	$F(2.53) < 3.14$
% Na		30 ±16	65 ±15*	68 ±16*	43 ±22	52 ±7	46 ±17	$F(2.53) < 4.38$

ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ . Promedio ± DE (desviación estándar)



**Fig. 8.** Porcentaje de entradas y de tiempo de permanencia en LEC, con la administración vo de fracciones del extracto metanólico. DZP= diazepam, TW= solución Tween 20 al 1%, %Na= porcentaje del número de cruces en brazos abiertos, %Ta= porcentaje de tiempo en brazos abiertos. ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ .

**Cuadro 16.** Efecto de las fracciones del extracto MeOH sobre parámetros de actividad motora.

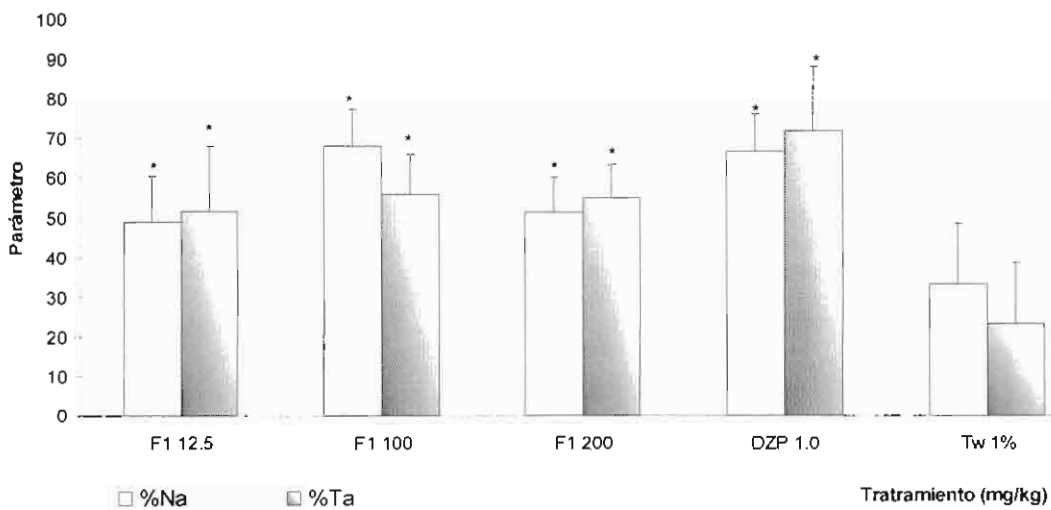
Tratamiento (mg/kg)	Cruces totales	Estiramientos verticales
F1 (100)	103.3 ±46.3	35.4 ±15.3
F2 (100)	84.3 ±17.1	34.7 ±12.9
F3 (100)	98.5 ±16.3	37.5 ± 6.4
F4 (100)	90.8 ±27.4	27.3 ±15
DZP (1.0)	113.3 ±30.1	32.4 ± 9.4
TW 1% (100 µl/10 g)	86.5 ±33.0	33.3 ± 9.3

La fracción F1 resultó la de mayor actividad y la evaluación de diferentes dosis de este extracto en el modelo LEC descrito (12.5 y 200 mg/kg), permitió establecer que, aún cuando no se observa una dependencia entre la dosis y el efecto ansiolítico, ambas dosis de la fracción incrementaron el porcentaje del % Na y % Ta (Figura 9) ( $p < 0.05$ , Cuadro 17).

**Cuadro 17.** Evaluación de diferentes dosis de F1 en LEC

P	Tx	Tw 1 %	DZP 1 mg/kg	F1 (mg/kg)			F(tablas) < F calculada
				12.5	100	200	
% Ta		23 ±10	71 ±11*	52 ±16*	56 ±10*	55 ±8*	$F(2.69) < 11.7$
% Na		33 ±15	67 ±8*	49 ±10*	68 ±9*	53 ±9*	$F(2.69) < 9.59$

ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ . Promedio ± DE (desviación estándar)



**Fig. 9.** Porcentaje de entradas y de tiempo de permanencia en LEC, con la administración vo de la fracción F1. DZP= diazepam, TW= solución Tween 20 al 1%, %Na= porcentaje del número de cruces en brazos abiertos, %Ta= porcentaje de tiempo en brazos abiertos. ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ .

**Cuadro 18.** Efecto de diferentes dosis de F1 sobre parámetros de actividad motora.

Tratamiento (mg/kg)	Cruces totales	Estiramientos verticales
F1 (12.5)	113 ±25	45 ± 9
F1 (100)	113 ±33	50 ±15
F1 (200)	131 ±14	62 ± 8
DZP (1.0)	105 ±23	33 ±18
TW 1% (100 µl/10 g)	90 ±12	43 ± 9



### 10.5. Sub-fracciones F1A, F1B, F1C, F1D

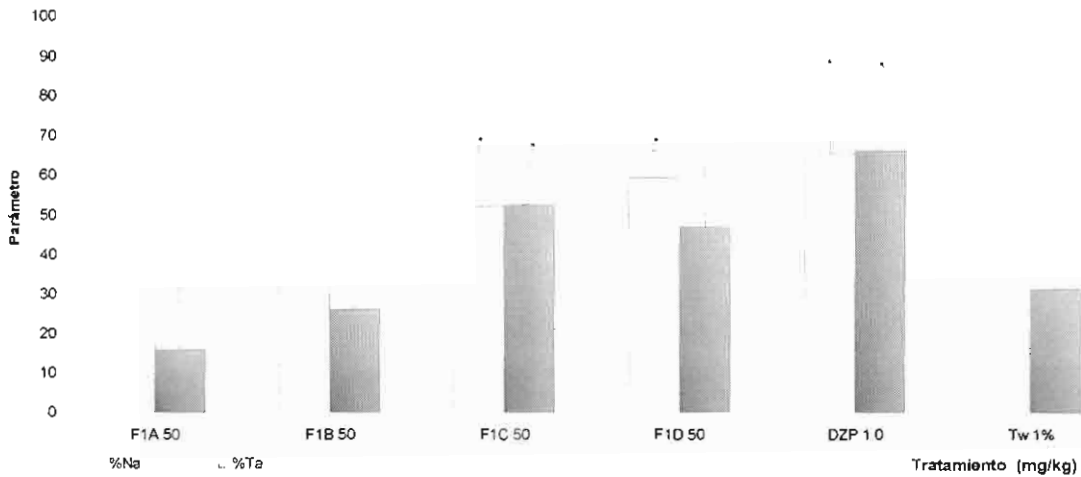
Las sub-fracciones F1A, F1B, F1C y F1D obtenidas a partir de F1 se evaluaron en el LEC y CA a la dosis de 50 mg/kg (vo). Las fracciones F1A y F1B no ejercieron cambios significativos en el comportamiento de los animales en el LEC ( $p > 0.05$ ). Por el contrario, las dos fracciones más polares incrementaron el porcentaje del número de cruces y del tiempo en el que permanecieron los ratones en los brazos abiertos del laberinto. La fracción F1D incrementó significativamente sólo %Na y aunque provocó cambios en % Ta éstos no fueron estadísticamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

Sin embargo, ambos se incrementaron significativamente en el grupo de ratones que recibió F1C ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 19, Figura 10).

**Cuadro19.** Evaluación de las sub-fracciones en LEC

P \ Tx	Tw 1 %	DZP 1 mg/kg	F1A	F1B	F1C	F1D	F(tablas) < F calculada
			50 mg/kg				
% Ta	31.2 ± 16	66.2 ± 19*	15 ± 20	26 ± 15	52.5 ± 10*	46 ± 14	F(2.58) < 5.01
% Na	36.3 ± 15	65.0 ± 19*	26 ± 25	32 ± 11	52 ± 14*	59 ± 6*	F(2.58) = 3.68

ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ . Promedio ± DE (desviación estándar)



**Fig. 10.** Porcentaje de entradas y el tiempo de permanencia en LEC, con la administración vo de 50 mg/kg de diferentes fracciones de F1 proveniente del extracto metanólico de *T. americana*. DZP= diacepam, TW= solución Tween 20 al 1%, %Na= porcentaje del número de cruces en brazos abiertos, %Ta= porcentaje de tiempo en brazos abiertos. ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ .

**Cuadro 20.** Sub-fracciones de F1 sobre parámetros de actividad motora.

Tratamiento (mg/kg)	Cruces totales	Estiramientos verticales
F1 A (50)	112.7 ±13.0	48.8 ±20.9
F1 B (50)	139.8 ±36.4	54.0 ± 8.7
F1 C (50)	128.3 ±12.7	44.0 ±15.1
F1 D (50)	120.0 ±20.4	36.5 ±15.2
DZP (1.0)	104.5 ±24.1	30.2 ± 5.5
TW 1% (100 µl/10 g)	114.8 ±11.7	44.7 ±14.3

### 10.5.1. Tilirósido y F'15

La separación de F1C dió como resultado varias fracciones una de las cuales presentaba un precipitado amarillo que fue identificado como tilirósido, un polifenol previamente descrito. También precipito otro compuesto, F'1. Ambos compuestos se disolvieron en una solución al 1 % de carboximetilcelulosa (CMC) y se administraron vía oral e intraperitoneal. La administración de 200 mg/kg vo del tilirósido incrementó significativamente el %Na y el % Ta, el compuesto F'15 no modificó los parámetros. Tampoco se vió efecto al administrar intraperitonealmente ambos compuestos en dosis de 60 y 100 mg/kg (Cuadros 21 y 22, Figura 11).

**Cuadro 21.** Evaluación del tilirósido en LEC

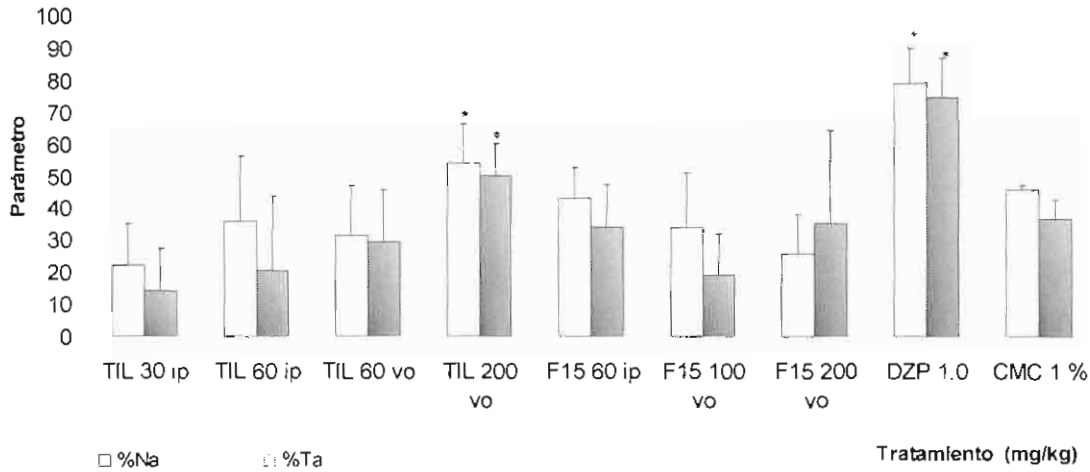
P \ Tx	CMC 1 %	DZP 1 mg/kg	Tilirósido (mg/kg)				F(tablas) < F calculada
			ip		vo		
			30	60	60	200	
% Ta	36 ±5	75 ±12*	14 ±11	20 ±20	29 ±16	54 ±10*	F (2.18) < 5.6
% Na	44 ±1	79 ±10*	22 ±13	35 ±20	31 ±15	56 ±12*	F (2.18) < 7.1

ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ . Promedio ± DE (desviación estándar)

**Cuadro 22.** Evaluación del F'15 en LEC

P \ Tx	CMC 1 %	DZP 1 mg/kg	F'15 (mg/kg)			F(tablas) < F calculada
			ip		vo	
			60	100	200	
% Ta	36 ±5	75 ±12*	34.0± 13.6	18.9±12	35.4±12	F (2.18) < 5.6
% Na	44 ±1	79 ±10*	43.2 ±9.6	34.1±29	25.9±10	F (2.18) < 7.1

ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ . Promedio ± DE (desviación estándar)



**Fig. 11.** Porcentaje de entradas y de tiempo que ratones gastan en LEC con la administración vo e ip Tilirósido (TIL) y F'15. DZP= diacepam, TW= solución Tween 20 al 1%, %Na= porcentaje del número de cruces en brazos abiertos, %Ta= porcentaje de tiempo en brazos abiertos. ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ .

**Cuadro 23.** Tilirósido y F'15 sobre parámetros de actividad motora.

Tratamiento (mg/kg)	Vía	Cruces totales	Estiramientos vertica
TIL (30)	ip	113.0 ±53.8	39.5 ±28.5
TIL (60)	ip	142.2 ±28.9	56.8 ±15.5
TIL (60)	vo	116.6 ±22.2	61.4 ±24.2
TIL (200)	vo	130.6 ±36.7	56.0 ±10.7
F15 (60)	ip	129.8 ±55.8	55.3 ±18.5
F15 (100)	vo	113.8 ±23.4	56.2 ±14.7
F15 (200)	vo	110.5 ±25.6	54.2 ±12.5
DZP (1.0)	ip	145.5 ±19.6	17.5 ±18.0
CMC (1%)	vo	176.8 ± 62.6	57.6 ±20.5

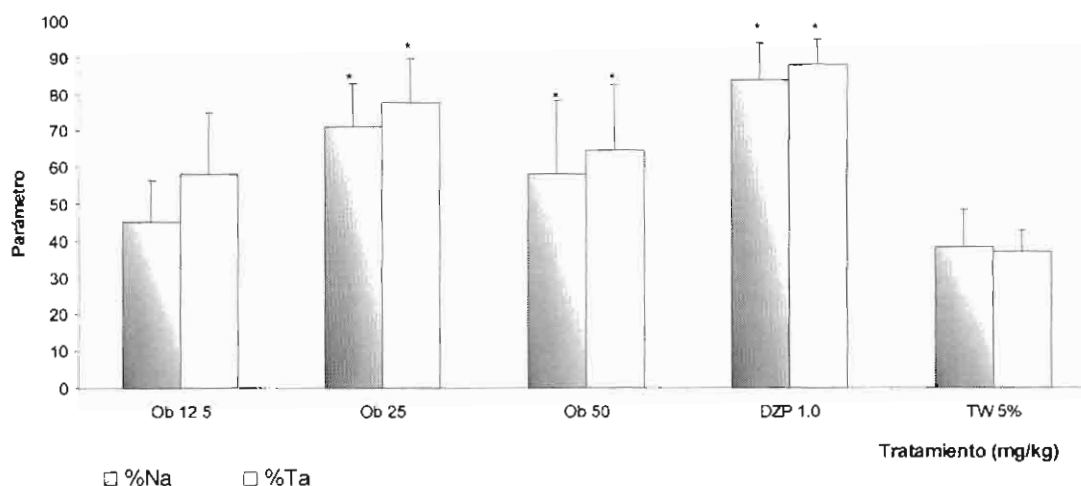
## 10.6. Extractos y fracciones de *O. basilicum*

La dosis de 12.5 mg/kg de HA de *O. basilicum* no tuvo efecto significativo sobre la conducta de los ratones evaluada como % Na y % Ta ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, las dosis mayores (25 y 50 mg/kg), incrementaron significativamente ( $p < 0.05$ ) estos parámetros (Cuadro 24, Figura 12) y no son significativamente diferentes con el grupo que recibió diacepam ( $p > 0.05$ ).

**Cuadro 24.** Evaluación del extracto HA de *O. basilicum* en LEC

P \ Tx	Tw 1 %	DZP 1 mg/kg	Extracto HA de <i>O. basilicum</i>			F(tablas) < F calculada
			12.5	25	50	
% Ta	36 ± 5	87 ± 6*	58 ± 16	77 ± 12*	64 ± 18*	F(2.73) < 14.11
% Na	38 ± 9	83 ± 10*	45 ± 11	71 ± 11*	58 ± 20*	F(2.70) < 9.52

ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ . Promedio ± DE (desviación estándar)



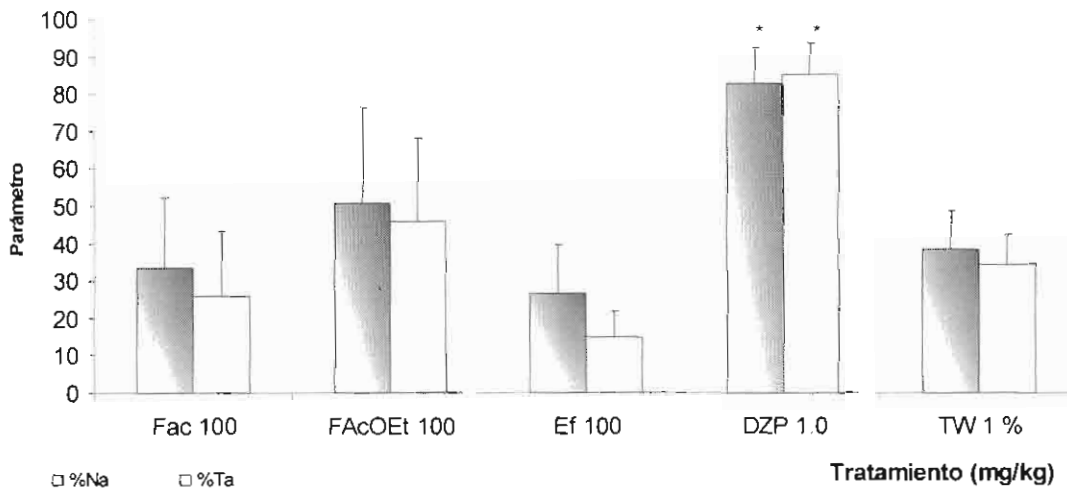
**Fig. 12.** Porcentaje de entradas y de tiempo en LEC con la administración vo del extracto HA de *O. basilicum* (Ob). DZP= diacepam, TW= solución Tween 20 al 1%, %Na= porcentaje del número de cruces en brazos abiertos, %Ta= porcentaje de tiempo en brazos abiertos. ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ , \* $p < 0.001$ .

Con los tratamientos provenientes de la bipartición del extracto HA de *O. basilicum*, se observó que la fracción de AcOEt inducía un aumento aunque no significativo ( $p < 0.05$ ) de %Na y % Ta. La fracción acuosa provocó una disminución de los mismos (Cuadro 25, Figura 12).

**Cuadro 25.** Evaluación de las fracciones de *O. basilicum* en LEC

P \ Tx	Tw 1 %	DZP 1 mg/kg	Extracto acuoso y bipartición de <i>O. basilicum</i> (100 mg/kg)			F(tablas) < F calculada
			Fac	FACOEt	Ef	
% Ta	34 ± 8	85 ± 8	26 ± 18	46 ± 22	26 ± 7	F(2.73) < 14
% Na	38 ± 10	83 ± 9	34 ± 19	50 ± 26	27 ± 13	F(2.70) < 9.5

ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ . Promedio ± DE (desviación estándar)



**Fig. 13.** Porcentaje de entradas y de tiempo que ratones gastan en LEC con la administración vo de 100 mg/kg extractos *O. basilicum* (AL). Fac= fracción acuosa de bipartición, FACOEt= fracción de acetato de etilo de bipartición, Ef= Extracto acuoso de hoja fresca, DZP= Diacepam, TW= solución Tween 20 al 1%, %Na= porcentaje del número de cruces en brazos abiertos, %Ta= porcentaje de tiempo en brazos abiertos. ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ .

**Cuadro 26.** Evaluación de la hoja fresca y fracciones de *O. basilicum* sobre parámetros de actividad motora..

<b>Tratamiento (mg/kg)</b>	<b>Cruces totales</b>	<b>Estiramientos verticales</b>
Fac100	94.6 ±32.1	30.6 ±15.5
FAcOEt	83.6 ±38.4	31.1 ±13.4
Ef	84.9 ±31.2	33.3 ±13.3
DZP (1.0)	100.3 ±30.0	32.4 ± 9.4
TW 1% (100 µl/10 g)	86.5 ±33.0	33.3 ±19.3

## 11. Discusión

Los trastornos mentales representan en la actualidad un severo problema de salud pública tanto para países industrializados como para los de economías emergentes. La ansiedad es un conjunto de trastornos que generan gran número de incapacidades laborales y los tratamientos utilizados tienen efectos indeseables. Datos epidemiológicos muestran que algunos trastornos de ansiedad constituyen las primeras causas de las enfermedades psiquiátricas <sup>Davis, 2002</sup>. Así mismo, son padecimientos que provocan estigmatización y discriminación, lo que ocasiona un problema social de importancia.

En 1990 se estimó que los problemas mentales y neurológicos eran la causa del 8.8 % de los años de vida perdidos por discapacidad. En 2002, esta carga había ascendido a más del doble, un 22.2 % <sup>Kohn et al., 2005</sup>. En América Latina el excedente por discapacidad es cada vez mayor y los trastornos crónicos están desplazando en prevalencia a enfermedades transmisibles, de tal manera que un número mayor de personas están en riesgo de sufrir trastornos mentales en la edad adulta <sup>PAHO, 2002</sup>.

Tomando en cuenta la epidemiología de los problemas mentales a nivel mundial, es claro que los sistemas de salud aunado a la terapia medicamentosa (que en la actualidad es costosa y con importantes efectos indeseables) no están cumpliendo de manera efectiva las demandas clínicas de salud mental. Esto da lugar, en parte, a la búsqueda de nuevas terapias para el tratamiento de los trastornos de ansiedad, donde la investigación de especies vegetales es una fuente importante de activos contra enfermedades del SNC <sup>Zhang, 2004</sup>. La investigación pre-clínica de los trastornos neuropsiquiátricos y su tratamiento se basa en gran medida en el uso de modelos animales, en el presente trabajo se utilizaron dos modelos etológicos, el CA y el LEC.

El CA es actualmente uno de los procedimientos que tiene una gran aceptación en el estudio de la conducta animal. El modelo fue descrito por Hall <sup>1934</sup>, para medir la "emocionalidad" en la rata. El roedor se expone a un medio ambiente desconocido debido a que el equipo contiene paredes, del cual no pueden escapar.. Las ratas en el campo abierto se mantuvieron en observación por 5 minutos y se determinó, que después de un ayuno de 24 y 48 hrs, los animales realizaban un mayor número de cruces en el campo y algunos no ingerían alimento, realizaban menos entradas a la



parte central del campo y tenían altos niveles de defecación. A estos animales se les clasificó como ratas “emocionales”. La prueba del CA se utiliza para el estudio no sólo ansiedad, también sedación y actividad motora, utilizando diferentes especies de roedores. Si bien, el incremento en la locomoción es un efecto estimulante del SNC, un decremento en la actividad de elevaciones verticales y locomoción se relaciona con sedación o postración post-ictal <sup>Prut y Belzung, 2003</sup>.

Los resultados observados en el presente estudio indican que la administración oral de los diferentes tratamientos, no indujeron cambios significativos en la conducta motora de los ratones. Es un antecedente que permite establecer que la administración oral de los productos no provoca sedación, ni depresión o estimulación general del SNC.

A su vez, el LEC, permite evaluar la reactividad que presentan los animales ante una situación de estrés conductual agudo. Este modelo se aplica para detectar actividad ansiolítica y ansiogénica de sustancias diversas; se basa en la conducta innata de exploración del entorno que caracteriza a los roedores. Pero además, los animales son sometidos a un estrés por el “miedo” que tienen al explorar los brazos abiertos del laberinto <sup>Lapiz-Bluhm et al., 2008</sup>, de tal forma que la conducta del animal en el laberinto representará un balance entre ambos comportamientos opuestos. El equilibrio en la conducta se rompe cuando se administran ansiolíticos que incrementan el número de cruces hacia los brazos abiertos y el tiempo que invierten los animales explorando dicho espacio. Este modelo etológico es parte de la gran batería de paradigmas conductuales que se han utilizado en el análisis de extractos vegetales con actividad sobre SNC. El modelo se fundamenta en la amplia validez predictiva que tiene; es decir, permite pronosticar que el efecto ansiolítico observado podrá ser reproducido en los ensayos clínicos. Este paradigma se ha utilizado por años debido a su utilidad y sencillez; se ha demostrado que la administración de fármacos ansiolíticos y ansiogénicos en animales expuestos al ambiente de este laberinto, modifican no sólo su conducta, sino también su fisiología como consecuencia del incremento sérico de corticosterona <sup>Pellow, 1985</sup>. En nuestro caso, la utilización de diazepam como control positivo, una benzodiazepina utilizada en la clínica para los trastornos mentales, permitió validar el modelo del LEC bajo nuestras condiciones experimentales. La

administración de 1.0 mg/kg ip de DZP provocó en todos los ensayos un aumento significativo en el número de cruces que los ratones realizaban en el compartimento abierto del LEC, así como en el tiempo que los animales permanecían en este espacio, lo que confirma el efecto ansiolítico que posee este fármaco.

Por otro lado, en el presente proyecto se llevo a cabo un experimento en el cual se administraron diferentes dosis de picrotoxina (PTX. 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.25 y 2.0 mg/kg ip), los resultados (ANEXO III) indican que esta sustancia provoca una disminución en el % Na y % Ta en el LEC. La PTX es un alcaloide aislado por primera vez de *Cocculus indicus*, farmacológicamente se comporta como un antagonista no-competitivo de los receptores GABA<sub>A</sub>, provocando excitación del SNC. Los datos obtenidos corroboran los efectos conductuales que posee esta sustancia, tales como disminuir la actividad motora espontánea de ratones en CA, disminución en el número de entradas y tiempo a brazos abiertos del LEC <sup>Stankevicius et al., 2008</sup> y por tanto validan el método bajo nuestras condiciones de trabajo.

La administración oral de los extractos metanólico e hidroalcohólico de *T. americana* indujeron un efecto ansiolítico en los ratones expuestos al LEC, siendo el extracto metanólico el de mayor actividad. El efecto ansiolítico de los extractos metanólico y hexánico ha sido reportado anteriormente <sup>Aguirre-Hernández, 2007a</sup> La administración intraperitoneal de estos extractos demostraron también una disminución significativa de la conducta motora espontánea de los animales en el modelo de CA con dosis de 30 mg/kg del extracto MeOH y de 10 mg/kg del hexánico, efecto que fue comparable aunque menos marcado que el inducido por DZP. El efecto ansiolítico se demostró con dosis menores a 300 mg/kg del extracto MeOH, sin embargo, al incrementar la dosis del producto disminuyó el efecto. Los autores de este trabajo sólo reportan el % Ta como índice de ansiolisis; probablemente el % Na se redujo dado que los autores de este trabajo detectan en los animales una disminución de la conducta motora. Además, con la administración de 500 mg/kg del extracto hexánico y 62 mg/kg del metanólico, los ratones presentaron una disminución en el número de asomadas ("head dipping", HD), mientras que los estiramientos verticales ("rears", R) disminuyeron con dosis de 141 mg/kg del extracto hexánico y con 10 mg/kg del metanólico. Estos parámetros son importantes cuando se valora el efecto ansiolítico de las sustancias ya

que se ha demostrado que un aumento en el número de HD correlaciona con la eficacia ansiolítica de los tratamientos, ejemplo de ello es el diazepam <sup>Cruz et al., 1994; Rodgers y Johnson, 1995</sup>. Así, el número de R se vinculará con un efecto ansiogénico y el comportamiento que tienen los ratones dentro del espacio de los brazos cerrados, con la medición de la actividad locomotora <sup>Rodgers y Johnson, 1997; Cole y Rodgers, 1994</sup>. Como el caso de la PTX que observamos que la administración de las diferentes dosis administradas provoca una disminución en el HD y R (ANEXO III), indicando que esta sustancia provoca efecto ansiogénico acompañado de una disminución de la actividad motora.

Los resultados obtenidos por Aguirre-Hernández y col., muestran claramente que el efecto ansiolítico de los tratamientos con *T. americana*, evaluado bajo sus condiciones experimentales, se vincula con una disminución de la actividad motora. Por otro lado, nuestro grupo de investigación demostró también que la administración intraperitoneal de diferentes dosis del extracto hidroalcohólico (3.12 a 50 mg/kg) de *T. americana*, produjo un aumento significativo y dependiente de la dosis en el %Ta y %Na en el modelo del LEC, efecto que se acompañó de un decremento significativo de la conducta motora. Con dosis más elevadas (>100 mg/kg) se registró un porcentaje elevado de mortalidad en el grupo de animales tratados con el producto vegetal. De acuerdo con el estudio reportado, la administración intraperitoneal de los extractos metanólico y hexánico tuvieron valores DL<sub>50</sub> de 375 mg/kg y de 2900 mg/kg respectivamente <sup>Aguirre-Hernández, 2007a</sup>. Aparentemente, los componentes polares de la planta resultan tener un alto grado de toxicidad, por lo menos por vía intraperitoneal. Haciendo una comparación con la toxicidad presentada por el extracto metanólico, en nuestro estudio, dosis menores del extracto hidroalcohólico administrado por esta misma vía provocaron la muerte de los animales <sup>Pacheco-Benitez, 2008</sup>.

Tomando en consideración estos antecedentes, para el presente estudio se llevó a cabo una valoración preliminar sobre la toxicidad aguda del extracto metanólico y se demostró que la administración oral diaria del extracto, en dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg por dos semanas, no inducía daños neurotóxicos aparentes según los parámetros conductuales analizados por la prueba de Irwin. Asimismo, no se detectaron cambios en las actividades de las enzimas transaminasa glutámico oxaloacética y pirúvica, ni en la creatinina, resultados que permiten asumir que el extracto MeOH no

provoca toxicidad hepática o renal (Anexo I). La actividad ansiolítica del extracto se demostró con una dosis de 100 mg/kg; es decir, la dosis tóxica está lejana de la terapéutica lo que indica un adecuado margen de seguridad para la vía oral que es la forma de uso popular de esta planta.

El monitoreo continuo de los extractos, fracciones y compuestos puros aislados de *T. americana* en el modelo de campo abierto mostró que las diferentes dosis de estos productos no modificaban la actividad motora espontánea de los animales. El estudio químico del extracto metanólico de *T. americana* condujo al aislamiento de tilirósido y a la detección por medio del análisis por HPLC de quercetina, quercitrina, rutina y canferol, flavonoides que suelen detectarse con frecuencia en la flora medicinal del país. Tilirósido es uno de los constituyentes mayoritarios en la planta.

La administración oral e intraperitoneal del tilirósido en dosis de 30 y 60 mg/kg no reprodujeron el efecto ansiolítico demostrado con el extracto a dosis desde 25 mg/kg, sin embargo, con 200 mg/kg se observó un aumento en el porcentaje de tiempo de permanencia en brazos abiertos (52.2 %) así como en el número de cruces (56.1 %) que los animales realizaban en estos espacios.

El tilirósido es un flavonoide ampliamente distribuido en el reino vegetal <sup>Stamboulia y Paris, 1961</sup> y se le reconocen importantes efectos biológicos. El compuesto es un agente antioxidante y antiinflamatorio <sup>Sala, 2003</sup>, inhibe el óxido nítrico, el factor de necrosis tumoral alfa, la interleucina 2 <sup>Rao et al., 2005</sup> y el sistema del complemento <sup>Jung et al., 1998</sup>; tiene actividad citotóxica <sup>Dimas et al., 2000; Rao et al., 2007</sup>, hepatoprotectora <sup>Matsuda et al., 2002</sup>, antibacteriana <sup>Ferreira et al., 2004</sup>; efecto antiamebiano y antigiardia <sup>Calzada y Alanís, 2007</sup>, este compuesto también es capaz de provocar una disminución de la grasa visceral y del peso corporal de ratones <sup>Ninomiya et al., 2007</sup>. Este es el primer reporte sobre la actividad que ejerce este flavonoide a nivel del SNC, específicamente como un agente con propiedades ansiolíticas.

En el estudio de las plantas medicinales, es frecuente que el proceso químico al que se someten los extractos o fracciones y que lleva a la identificación de uno o más compuestos activos, de como resultado el aislamiento de compuestos que tienen menor actividad biológica que la del extracto crudo. Tal es el caso del tilirósido cuya actividad ansiolítica se registró con una dosis de 200 mg/kg, en tanto que la actividad del extracto

metanólico se demostró en un rango de dosis de 25 a 100 mg/kg. Este dato permite sugerir que el efecto ansiolítico de la planta pudiera deberse a la interacción entre los flavonoides (tilirósido, quercetina, quercitrina, rutina, canferol y otros no identificados), siendo el tilirósido uno de los compuestos importantes en el efecto ya que es el constituyente mayoritario.

A pesar de que no existe una vasta información sobre la actividad ansiolítica o sedante de los flavonoides arriba referidos, hay datos que permiten establecer la posible responsabilidad que tienen en los trastornos psiquiátricos. Otros investigadores también han hecho referencia del posible efecto sedante y ansiolítico de los flavonoides contenidos en esta planta <sup>Pérez-Ortega et al., 2008</sup>.

A los flavonoides se les reconocen propiedades antioxidantes. Si bien, los modelos utilizados en el presente trabajo no permiten determinar la forma y blanco de acción que tienen los productos de *T. americana*, es posible especular que el efecto se debe, en parte, a la capacidad que éstos tienen de disminuir el estado oxidativo en los ratones que han sido expuestos al estrés y /o ansiedad. El estrés oxidativo es uno de los principales factores que contribuyen a la alteración de la homeostasis y llevan a diversas condiciones patológicas, incluyendo los problemas neuropsiquiátricos. De hecho, es baja la defensa antioxidante que tiene el cerebro, cuya constitución es rica en lípidos y mantiene un consumo elevado de O<sub>2</sub> <sup>Ng, 2008</sup>. Existe una correlación entre los niveles de ansiedad y el nivel de oxidación en las células neuronales y gliales del cerebelo, en el hipocampo y en las neuronas de la corteza cerebral <sup>Rammal, 2008</sup>. Todas estas zonas son importantes estructuras que forman parte del circuito de la ansiedad <sup>McNaughton et al., 2007; Rempel-Clower, 2007</sup>.

Quercetina es uno de los flavonoides identificados en la fracción F1C y su capacidad antioxidante le ha conferido efectos neuroprotectores en el tratamiento de diferentes trastornos neurológicos. El compuesto inhibe el proceso oxidativo y protege a los animales del estrés conductual inducido por estrés oxidativo <sup>Kumar, 2008</sup>. Un glicósido de quercetina, el 3,7-O- $\alpha$  dirhamnósido de quercetina, aislado de *T. argentea*, ha demostrado poseer potente actividad antinociceptiva y antiinflamatoria a 50 mg/kg <sup>Toker, 2004</sup>. La administración oral (300 mg/kg) e intranasal (20  $\mu$ g/día) del compuesto indujo un efecto ansiolítico y nootrópico en los animales que fueron sometidos al paradigma de

LEC y laberinto Morris de agua <sup>Priprem, 2008</sup>. Otro derivado, la quercitrina, no tiene efecto ansiolítico; sin embargo, bloquea el sitio de unión del flumazenil con el receptor GABA<sub>A</sub> en el cerebro de ratas <sup>Baureithel, 1997</sup>, también se le demostró actividad antioxidante <sup>Wagner, 2006</sup>.

La administración de rutina bloquea parcialmente el aumento de la temperatura corporal en los ratones expuestos a estrés inescapable en el campo abierto <sup>Grundmann, 2006</sup>. En un modelo de discinesia tardía (trastorno motor de la región orofacial, asociado al tratamiento crónico de la esquizofrenia) inducida por haloperidol (antagonista de los receptores tipo D2 para dopamina) se demostró la capacidad neuroprotectora que tiene este glicoflavonoide <sup>Bishnoi, 2007</sup> y la administración de 10 y 20 mg/kg de rutina tuvo un efecto sedante al potenciar el efecto hipnótico del tiopental <sup>Fernández et al., 2006</sup>. Finalmente, a canferol se le ha demostrado actividad antioxidante <sup>Gabrielska et al., 2005</sup>.

Por otro lado, se ha demostrado que ciertos flavonoides de origen vegetal tienen la capacidad de unirse o de modular al receptor GABA<sub>A</sub>, complejo involucrado en diversas patologías del SNC, entre ellas la ansiedad y la epilepsia. La rutina actúa protegiendo a las ratas de las convulsiones inducidas químicamente, efecto que es bloqueado por el flumazenil (antagonista del sitio de unión a benzodiazepinas <sup>Nassiri-Asl, 2008</sup>), lo que indicaría que el posible mecanismo de acción anticonvulsivante de rutina es a nivel de los receptores GABA<sub>A</sub>. Los flavonoides hipidulin y cirsilineol aislados de *Artemisia heba-alba* <sup>Salah y Jäger, 2005</sup>, las flavonas 6, 2'-hidroxi-5,7,8,6'-tetrametoxiflavona y 5,7,2'-trihidroxi-6,8-dimetoxiflavona aisladas de *Scutellaria baicalensis* Georgi <sup>Wang et al., 2002</sup>, tienen la capacidad de unirse al receptor GABA<sub>A</sub>. La propiedades biológicas que tienen los compuestos mencionados y otros flavonoides, apoya la hipótesis respecto a las potencialidades terapéuticas que ofrecen en el tratamiento de los trastornos neurológicos como ansiedad, sedación y convulsiones <sup>Marder y Paladini, 2002</sup>.

No existen datos en la literatura científica sobre los efectos de *O. basilicum* como ansiolítico, tampoco hay antecedentes respecto al uso que tiene esta planta en la medicina tradicional para tratar específicamente trastornos del SNC; sin embargo, entre los curanderos o chamanes de México, son muy apreciadas las hojas frescas para el ritual de las "limpias" <sup>Argueta, 1994, Zolla, 1988</sup>; probablemente, los aceites esenciales que desprenden las hojas al ser frotadas sirvan para tranquilizar a la persona. Este fue uno

de los argumentos que se tomó en consideración en la propuesta de trabajo para evaluar el efecto ansiolítico de *O. basilicum*. Por otro lado, una de las especies más estudiadas del género *Ocimum* es *O. sanctum* (Albahaca morada) <sup>Prakash et al., 2005</sup> y se ha demostrado que tiene potente actividad anti-estrés. La administración de un extracto hidroalcohólico de esta especie controla la alteración que produce un ruido potencialmente nocivo en los niveles de los neurotransmisores <sup>Ravindran et al., 2005</sup> y el extracto metanólico de las raíces provoca en los roedores una disminución en el tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada, sugiriendo un efecto antidepresivo <sup>Maity et al., 2000</sup>.

En el presente trabajo se demostró que el extracto hidroalcohólico de *O. basilicum* fue activo en el modelo LEC con dosis relativamente bajas (25 y 50 mg/kg), sin embargo, no fue posible reproducir el efecto con las fracciones. Asumimos por el momento, que la actividad sobre SNC de la planta se debe al contenido de aceites esenciales: linalol con propiedades antioxidantes <sup>Sacchetti et al., 2004; Berić et al., 2008</sup>,  $\alpha$ -tocoferol y ácido linoléico <sup>Gülçin et al., 2007</sup>. En diferentes modelos biológicos se demostró la actividad anti-estrés de linalol <sup>Umezu et al., 2006</sup>, la capacidad de reducir la actividad motora espontánea en los ratones (posible efecto sedante) <sup>Buchbauer et al., 1993</sup> y su efecto analgésico <sup>Peana et al., 2003</sup>.

*O. basilicum* es una planta de alto consumo humano, no tiene efectos tóxicos. Es considerada una especie *gras* (Substances that are generally recognized as safe) por la FDA (Federal Drug Administration, en el código 21 CFR secciones 182.10, 182.20 [1982], <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/fcf182.html>), por lo que se puede proponer como una candidata adecuada para continuar con su estudio relacionado a su actividad sobre SNC y una vez demostrada con un mayor número de experimentos, poder someterla a un estudio para el desarrollo de un fitomedicamento y finalmente a un ensayo clínico-piloto.

Con respecto a *T. americana* es necesario llevar a cabo una serie de estudios, que permitan establecer de manera contundente la baja o nula actividad tóxica del extracto o fracción activa, para posteriormente poder proponerla como posible ansiolítico susceptible de ser evaluado en la clínica.

## 12. Conclusiones

- 12.1.El extracto metanólico de *Tilia americana* y su fracción de flavonoides (quercetina, quercitrina, rutina, canferol y tilirósido) poseen actividad ansiolítica sin alteraciones de la actividad motora espontánea.
- 12.2.El tilirósido a 200 mg /kg vía oral provoca un efecto ansiolítico por aumentar significativamente el % Na y % Ta en el LEC, sin modificaciones de la actividad motora espontánea.
- 12.3.El extracto hidroalcohólico de *Ocimum basilicum* tiene un efecto ansiolítico significativo en el LEC, sin embargo cuando el extracto es fraccionado la actividad biológica no es observada en el modelo utilizado.



## 13. Perspectivas

- 13.1. Llevar a cabo un proyecto que permita conocer la modulación del sistema GABAérgico por el tilirósido y aislar otros flavonoides de *T. americana* que posean actividad ansiolítica y evaluarlos sobre este sistema de neurotransmisión.
- 13.2. Evaluar la interacción farmacológica entre diferentes compuestos ansiolíticos para conocer la concentración adecuada de cada uno de éstos en un extracto (fitomedicamento), susceptible de ser evaluado clínicamente.
- 13.3. Llevar a cabo el diseño y desarrollo de una preparación farmacéutica estandarizada en los flavonoides activos, para ser evaluada clínicamente en pacientes con trastornos de ansiedad.
- 13.4. Llevar a cabo el análisis toxicológico de esta preparación farmacéutica, administrándola crónicamente vía oral, utilizando técnicas bioquímicas, conductuales e histopatológicas.
- 13.5. Para la especie *O. basilicum* es necesario llevar a cabo un mayor número de pruebas fitoquímicas y farmacológicas que permitan dilucidar el compuesto activo e incluso probar el aceite esencial de esta planta.

## 14. Referencias bibliográficas

1. Aguirre-Hernández E, Martínez AL, González-Trujano, Moreno J, Vibrans H, Soto-Hernández M. Pharmacological evaluation of anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. *mexicana* in mice. J Ethnopharmacol 2007a; 109: 140-145.
2. Aguirre-Hernández E, Rosas-Acevedo H, Soto-Hernández M, Martínez AL, Moreno J, González-Trujano ME. Bioactivity-guided isolation of beta-sitosterol and some fatty acids as active compounds in the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* var. *mexicana*. Planta Med 2007b; 73: 1148-1155.
3. APG II, 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Botanical Journal of the Linnean Society 2003; 141: 399-436.
4. Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. Anim Behav 1973; 21: 205-235.
5. Argueta, A. Cano L, Rodarte M. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana I, II y III. México, D.F. Instituto Nacional Indigenista.; 1994a; Pp: 1337,1355.
6. Argueta, A. Cano L, Rodarte M. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana I, II y III. México, D.F. Instituto Nacional Indigenista.; 1994b; Pp: 86,175.
7. Barnard EA, Skolnick P, Olen RW, Möhler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. Subtypes of  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptors: classification on the bases of subunit structure and receptor function. Pharmacol Rev 1998; 50: 291-313.
8. Baureithel KH, Büter KB, Engesser A, Burkard W, Schaffner W. Inhibition of benzodiazepine binding in vitro by amentoflavone, a constituent of various species of *Hypericum*. Pharm Acta Helv 1997; 72: 153-7.
9. Bello, 1993 Bello G. Plantas Útiles no Maderables de la Sierra Purépecha, Michoacán, México, INIFAP. México. Folleto Técnico 1993; Pp: 10-115.

10. Berić T, Nikolić B, Stanojević J, Vuković-Gaćić B, Knezević-Vukcević J. Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 724-732.
11. Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni SK. Protective effect of rutin, a polyphenolic flavonoid against haloperidol-induced orofacial dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes. *Fundam Clin Pharmacol* 2007; 21: 521-529.
12. Borman J. The "ABC" of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21: 16-19.
13. Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ: International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid (B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 247-264.
14. Brands, SJ. (Comp.) 1989-present. *Systema Naturae 2000. The Taxonomicon*. Universal Taxonomic Services, Amsterdam, The Netherlands.
15. Buchbauer G, Jirovetz L, Jager W, Plank C, Dietrich H. Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. *J Pharm Sci* 1993; 82: 660-664.
16. Bull L. Biosynthesis of caffeic acid and eugenol in *Ocimum basilicum*. *Groupe Polyphenols* 1980; 9: 289-293.
17. Calzada F, Alanís AD. Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. *Phytother Res* 2007; 21: 78-80.
18. Candland DK, Nagy ZM. The open field: some comparative data. *Ann NY Acad Sci* 1969; 159: 831-851
19. Charney DS, Woods SW, Goodman WK, Heninger GR. Neurobiological mechanisms of panic anxiety: biochemical and behavioral correlates of yohimbine-induced panic attacks. *Am J Psychiatry* 1987; 144: 1030-1036.
20. Cole JC, Rodgers RJ. Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in the murine elevated plus-maze test: comparison with haloperidol. *Psychopharmacology (Berl)* 1994; 114: 2888-296.
21. Coleta M, Campos MG, Cotrim MD, Proenca da Cunha A. Comparative evaluation of *Melissa officinalis* L., *Tilia europaea* L., *Passiflora edulis* Sims. and

- Hypericum perforatum* L. in the elevated plus maze anxiety test. Pharmacopsychiatry 2001; 34 Suppl1: S20-21.
22. Corp ER, Gründer G, Lüddens H. Drug interactions at GABA<sub>A</sub> receptors. Progress in Neurobiol 2002; 67: 113-159.
  23. Cronquist A. The Evolution and Classification of Flowering Plants. New York Botanical Garden, Cronx, New York 2da Ed. 1988.
  24. Cruz AP, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. Pharmacol Biochem Behav 1994; 49: 171-176.
  25. Cryan JF, Kelly PH, Chaperon F, Gentsch C, Mombereau C, Lingenhoehl K, Froestl W, Bettler B, Kaupmann K, Spooren PJM. Behavioral Characterization of the Novel GABA<sub>B</sub> receptor- positive modulator GS39783 (N, N -dicyclopentyl-2-methylsulfanyl-5-nitro-pyrimidine-4,6-diamine): Anxiolytic-like activity without side effects associated with baclofen or benzodiazepines. J Pharmacol Exp Ther 2004; 310: 952-963.
  26. Dandiya PC, Gupta BD, Gupta ML, Patni SK. Effects of LSD on open field performance in rats. Psychopharmacologia 1969; 15: 333-340.
  27. Dandiya PC, Gupta BD, Gupta ML. A comparative effect of central nervous system acting drugs on the open field performance in rats. Indian J Med Res 1970; 58: 487-494.
  28. Davidson RJ. Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. Biol Psychiatry 2002; 51: 68-80.
  29. Davidson JR. Use of Benzodiazepines in social anxiety disorder, generalized anxiety disorder, and posttraumatic stress disorder. J Clin Psychiatry 2004; 65 Suppl 5: 29-33.
  30. Davis M. Neural circuit of anxiety and stress disorders. In: Neuropsychopharmacology. 5th Ed. American College of Neuropsychopharmacology. Kenneth LD, Charnery D, Coyle JT. (eds). Ed. Williams and Wilkins Publishers 2002. Pp: 931-953
  31. Di Cesare LF, Forni E, Viscardi D, Nani RC. Changes in the chemical composition of basil caused by different drying procedures. J Agric Food Chem 2003; 51: 3575-3581.

32. Dimas K, Demetzos C, Mitaku S, Marselos M, Tzavaras T, Kokkinopoulos D. Cytotoxic activity of kaempferol glycosides against human leukaemic cell lines in vitro. *Pharmacol Res* 2000; 41: 85-88.
33. Fernández SP, Wasowski C, Loscalzo L, Granger RE, Johnston GAR, Paladini AC, Marder M. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *Eur J Pharmacol* 2006; 539: 168-176.
34. Ferreira EO, Salvador MJ, Pral EM, Alfieri SC, Ito IY, Dias DA. A new heptasubstituted (E)-aurone glucoside and other aromatic compounds of *Gomphrena agrestis* with biological activity. *Z Naturforsch* 2004; 59: 499-505.
35. File SE, Kenny PJ, Cheeta S. The role of the dorsal hippocampal serotonergic and cholinergic systems in the modulation of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 66: 65-72.
36. Gabrielska J, Soczyńska-Kordala M, Przystalski S. Antioxidative effect of kaempferol and its equimolar mixture with phenyltin compounds on UV-irradiated liposome membranes. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 76-83.
37. Garankani A, Mathew SJ, Charney DS. Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. *Mt Sinai J Med* 2006; 73: 941-949.
38. Grayer RJ, Kite GC, Goldstone FJ, Bryan SE, Paton A, Putievsky E. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry* 1996; 43:1033-1039.
39. Grundmann O, Kelber O, Butterweck V. Effects of St. John's Wort extract and single constituents on stress-induced hyperthermia in mice. *Planta Med* 2006; 72: 1366-71.
40. Gülçin I, Elmastaş M, Aboul-Enein HY. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) assayed by different methodologies. *Phytother Res* 2007; 21: 354-361.
41. Hall CS. Emotional Behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol* 1934; 18: 385-403.
42. Herrera-Arellano A, Jiménez-Ferrer E, Zamilpa A, Morales-Valdéz M, García-Valencia CE, Tortoriello J. Efficacy and tolerability of a standardized herbal product

from *Galphimia glauca* on generalizad anxiety disorder. A randomized, double-blind clinical trial cotrolled with lorazepam. *Planta Med* 2007; 73: 713-717.

43. Hockok LG, Anway JC. Morphological and chemical analysis of geographical variation in tilia of eastern North America. *Brittonia* 1972; 1: 2-8.
44. Hodisan L. Polyphenols of *Ocimum basilicum*. *Clujul Med* 1987; 60: 340-343.
45. Interaminense LF, Leal-Cardoso JH, Magalhaes PJ, Duarte GP, Lahlou S. Enhanced hypotensive effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves and its main constituent, eugenol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. *Planta Med* 2005; 71: 376-378.
46. Javasinghe C, Gotoh N, Aoki T, Wada S. Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Agric Food Chem* 2003; 51: 4442-4449.
47. Jung KY, Oh SR, Park SH, Lee IS, Ahn KS, Lee JJ, Lee HK. Anti-complement activity of tiliroside from the flower buds of *Magnolia fargessi*. *Biol Pharm Bull* 1998; 10: 1077-1078.
48. Kelm MA, Nair MG, Strasburg GM, DeWitt DL. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. *Phytomedicine* 2000; 7: 7-13.
49. Kent JM, Mathew SJ, Gorman JM. Molecular targets in the treatment of anxiety. *Biol Psychiatry* 2002; 52: 1008-1030.
50. Kessler R, Greenberg P. Chapter 67: The economic burden of anxiety and stress disorders. In: *Neuropsychopharmacology: The fifth Generation of Progress*. Davis K, Charney D, Coyle J, Nemeroff C Editors. Lippincott Williams and Wilkins, 2002, USA, Pp: 981-992.
51. Kohn R, Levav I, Caldas de Almeida JM, Vicente B, Andrade L, Caraveo-Anduaga JJ, Saxena S, Saraceno B. Los trastornos mentales en América Latina y el Caribe: asunto prioritario para la salud pública. *Rev Panam Salud Pública/ Pan Am J Public Health* 2005; 18: 229-240.
52. Korte SM, De Boer SF. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur J Pharmacol* 2003; 463: 163-175.

53. Kulkarni SK, Dandiya PC. A comparative study of the influence of 6-hydroxydopamine, alpha methyltyrosine and 5,6-dihydroxy-tryptamine, p-chlorophenylalanine on the open field behaviour of rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 1974; 18: 324-329.
54. Kumar A, Goyal R. Quercetin protects against acute immobilization stress-induced behaviors and biochemical alterations in mice. *J Med Food* 2008; 11: 469-73.
55. Lapid-Bluhm MDS, Bonde CO, Doyen J, Rodriguez GA, Bédard-Arana T, Morilak DA. Behavioural assays to model cognitive and affective dimensions of depression and anxiety in rats. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 1115-1137.
56. Maity TK, Mandal SC, Saha BP, Pal M. Effect of *Ocimum sanctum* roots extract on swimming performance in mice. *Phytother Res* 2000; 14: 120-121.
57. Marder M, Paladini AC. GABA<sub>A</sub>-receptor ligands of flavonoid structure. *Curr Top Med Chem* 2002; 2: 853-867.
58. Martínez SM. Plantas Autóctonas y Productos Volcánicos de las Inmediaciones de Morelia. Biblioteca de Científicos Nicolaitas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo 1987; Pp10.
59. Matsuda H, Ninomiya K, Shimoda H, Yoshikawa M. Hepatoprotective principles from the flowers of *Tilia argentea* (linden): structure requirements of tiliroside and mechanisms of action. *Bioorg Med Chem* 2002; 10:707-12.
60. Mauk MD, Peroutka SJ and Kocsis JD. Buspirone attenuates synaptic activation of hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* 1988; 8:1- 11.
61. McAllister- Williams R. H., Ferrier IN, Young AH. Mood and neuropsychological function in depression: the role of corticosteroids and serotonin. *Psychol Med* 1998; 28: 573-584.
62. McNaughton N, Kocsis B, Hajós M. Elicited hippocampal theta rhythm: a screen for anxiolytic and procognitive drugs through changes in hippocampal function? *Behav Pharmacol* 2007; 18: 329-46.
63. Mediratta PK, Sharma KK, Singh S. Evaluation of immunomodulatory potential of *Ocimum sanctum* seed oil and its possible mechanism of action. *J Ethnopharmacol* 2002; 80: 15-20.

64. Mehta AK, Ticku MK. An update on GABAA receptors. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 29:196-217.
65. Miele M, Dondero R, Ciarallo G, Mazzei M. Methyleugenol in *Ocimum basilicum* L. Cv. genovese gigante. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 517-521.
66. Miserandino MJD, Sananes CB, Melia KR, Davis M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature* 1990; 345: 716-718.
67. Moraes CLK, Bertoglio LJ, Carobrez AP. Interplay between glutamate and serotonin within the dorsal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior of rats exposed to the elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 2008; 194: 181-186.
68. Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernández A, Ma S, Petre CO. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29: 1214- 1224.
69. Nash JR, Nutt DJ. Pharmacotherapy of anxiety. *Handb Exp Pharmacol* 2005; 169: 469-501.
70. Nassiri-Asl M, Shariati-Rad S, Zamansoltani F. Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008; 32: 989-93.
71. Ng F, Berk M, Dean O, Busch AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008; 11: 851-876.
72. Ninan, P. "The Functional Anatomy, Neurochemistry and Pharmacology of Anxiety" *J. Clin Psychiatry* 1999, Suppl 22: 12-17.
73. Ninomiya K, Matsuda H, Kubo M, Morikawa T, Nishida N, Yoshikawa M. Potent anti-obese principle from *Rosa canina*: structural requirements and mode of action of trans-tiliroside. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17: 3059-3064.
74. Ong J, Derr DI. Clinical potential of GABA<sub>B</sub> receptor modulators. *CNS Drug Rev* 2005; 11: 317-334.
75. Oswiecimska and Bednarska, 1976 Oswiecimska M, Bednarska D. Photometric determination of leucoanthocyanidin-proanthocyanin. *Herba Hung* 1976; 15: 57-61.



76. Oswiecimska M, Bednarska D, Sgarkowska J. Protoanthocyanidins (leukoanthocyanidins) in inflorescentia *Tilia*. *Herba Pol* 1976; 22: 17-22.
77. Pacheco-Benítez DI. Evaluación farmacológica en SNC de Extractos de *Tilia americana*, var. *mexicana* (Schltdl) Hardin. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Morelos. 2008.
78. Pan American Health Organization. Health in the Americas 2002. Washington, D.C. PAHO; 2002.
79. Pare D, Quier GJ, Ledoux JE. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiol* 2004; 92: 1-9.
80. Peana AT, D'Aquila PS, Chessa ML, Moretti MDL, Serra G, Pippia P. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. *Eur J Pharmacol* 2003; 460: 37-41.
81. 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: 149-167.
82. Pérez-Ortega G, Guevara-Fefer P, Chávez M, Herrera J, Martínez A, Martínez AL, González-Trujano ME. Sedative and anxiolytic efficacy of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences used traditionally by communities of state of Michoacan, Mexico. *J Ethnopharmacol* 2008; 116: 461-468.
83. Prakash P, Gupta N. Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review. *Indian J Physiol Pharmacol* 2005; 49: 125-131.
84. Pripem A, Watanatorn J, Sutthiparinyanont S, Phachonpai W, Muchimapura S. Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. *Nanomedicine* 2008; 4: 70-8.
85. Prut L, Belzung C. The open fields as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003; 463: 3-33.
86. Rammal H, Bouayed J, Younos C, Soulimani R. Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice. *Brain Behav Immun* 2008, doi: 10.1016/j.bbi.2008.06.005

87. Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. Inhibitory effects of the flavonoids isolated from *Waltheria indica* on the production of NO, TNF-alpha and IL-12 in activated macrophages. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 912-915.
88. Rao YK, Geethangili M, Fang SH, Tzeng YM. Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: a comparative study. *Food Chem Toxicol* 2007; 45: 1770-6.
89. Ravindran R, Rathinasamy SD, Samson J, Senthilvelan M. Noise-stress-induced brain neurotransmitter changes and the effect of *Ocimum sanctum* (Linn) treatment in albino rats. *J Pharmacol Sci* 2005; 98: 354-360.
90. Rempel-Clower NL. Role of orbitofrontal cortex connections in emotion. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1121: 72-86.
91. Rocca P, Fonzo V, Scotta M, Zanalda E, Ravizza L. Paroxetine efficacy in the treatment of generalizad anxiety disorder. *Acta Psychiatr Scand* 1997; 95: 444-450.
92. Rodgers RJ, Johnson JT. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 52: 297-303.
93. Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brasz J Med Biol Res* 1997; 30: 289-304.
94. Rudolph U, Möhler H. GABA-based therapeutic approaches: GABA<sub>A</sub> receptor subtype functions. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 18-23.
95. Sacchetti G, Medici A, Maietti S, Radice M, Muzzoli M, Manfredini S, Braccioli E, Bruni R. Composition and functional properties of the essential oil of Amazonian basil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in comparison with commercial essential oils. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 3486-3491.
96. Sala A, Recio MC, Schinella GR, Máñez S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M, Rosí JL. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *Eur J Pharmacol* 2003; 461: 53-61.
97. Salah SM, Jäger AK. Two flavonoids from *Artemisia herba-alba* Asso with in vitro GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptor activity. *J Ethnopharmacol* 2005; 99: 145-6.

98. Sandford, JJ, Spilios VA, Nutt DJ. The psychobiology of anxiolytic drugs: Part 1. Basic neurobiology. *Pharmacol Ther* 2000; 88: 197-212.
99. Schousboe A, Waagepetersen HS. Cap 9: GABA Neurotransmission: An Overview. En: *Handbook Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Springer 2008: 213-226.
100. Shoepf DD, Wright RA, Levine LR, Gaydos B, Potter WZ. LY354740, an mGlu2/3 receptor agonist as a novel approach to treat anxiety/stress. *Stress* 2003; 6: 189-197.
101. Skaltsa H, Philianos S. Chemical study of *Ocimum basilicum* L. *Planta Med Phytother* 1986; 20: 291-299.
102. Skaltsa H, Philianos S. Chemical study of *Ocimum basilicum* L. Part 2. *Plant Med Phytother* 1990; 24: 193-196.
103. Stahl, Stephen. "Psicofarmacología Esencial. Bases neurocientíficas y aplicaciones clínicas". Cap 7, Traducido por Rosa Redolat Ibarra, 1998. Editorial Planeta Argentina. Fascículo 4, 247-304.
104. Stamboulia A, Paris R. The flavonoids of the platan (*Platanus occidentalis* L.). Isolation of tiliroside from the leaves and of hyperoside from the male inflorescence. *Ann Pharm Fr* 1961; 19: 732-739.
105. Stankevicius D, Rodrigues-Costa EC, Camilo Flório J, Palermo-Neto J. Neuroendocrine, behavioral and macrophage activity changes induced by picrotoxin effects in mice. *Neuropharmacol* 2008; 54: 300-308.
106. Toker G, Küpeli E, Memisoglu M, Yesilada E. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *J Ethnopharmacol* 2004; 95: 393-397.
107. Tomas-Barberan FA, Wollenweber E. Flavonoid aglycons from the leaf surfaces of some Labiate species. *Plant Syst Evol* 1990; 173: 109-118.
108. Umezu T, Nagano K, Ito H, Kosakai K. Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active constituents. *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 85: 713-721.
109. Valencia Collazos M. Trastornos Mentales y Problemas de Salud Mental. Día Mundial de la Salud Mental 2007. *Salud Mental* 2007; 30: 75-80.

110. Vicini S, Ortinski P. Genetic manipulations of GABA<sub>A</sub> receptor in mice make inhibition exciting. *Pharmacol Ther* 2004; 103: 109-120.
111. Vieira RF, Grayerb RJ, Potonb AJ. Chemical profiling of *Ocimum americanum* using external flavonoids. *Phytochemistry* 2003; 63: 555–567.
112. Viola H, Wolfman C, Levi de Stein M, Wasowski C, Pena C, Medina JH, Paladini AC. Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tomentosa* (Tiliaceae) *J Ethnopharmacol* 1994; 44: 47-53.
113. Wagner C, Fachinetto R, Dalla Corte CL, Brito VB, Severo D, de Oliveira Costa Dias G, Morel AF, Nogueira CW, Rocha JB. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro. *Brain Res* 2006; 1107: 192-198.
114. Wang T, Cui SY, Hu XL, Lu RH. Study on the constituents of volatile oil from *Ocimum basilicum*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2003; 28: 740-742.
115. Wang H, Hui KM, Xu S, Chen Y, Wong JT, Xue H. Two flavones from *Scutellaria baicalensis* Georgi and their binding affinities to the benzodiazepine site of the GABA<sub>A</sub> receptor complex. *Pharmazie* 2002; 57: 857-858.
116. World Health Organization. Neurological Disorders. Public Health Challenges, 2006.
117. World Health Organization. The World Health Report. In: Mental Health: New Understanding, New Hope. WHO, Geneva, 2004.
118. World Health Organization. Mental and Neurological Disorders, Geneva, 2001.
119. <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/fcf182.html>
120. [www.insp.mx/Portal/Noticias/Marzo06/noticia130306\\_2.htm](http://www.insp.mx/Portal/Noticias/Marzo06/noticia130306_2.htm).
121. [www.reforma.com/negocios/articulo/465/928530](http://www.reforma.com/negocios/articulo/465/928530)
122. Zhang ZJ. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sci* 2004; 75: 1659-1699.
123. Zorumski CF, Isenberg Ke. Insights into the structure and function of GABA-benzodiazepine receptors: ion channels and psychiatry. *Am J Psychiatry* 1991; 148: 162-173.
124. Zolla C, Del Bosque S, Tascon MA, Mellado VC., 1988. *Medicina Tradicional y Enfermedad*. Cap V, 83-99.
125. Zub MR, Flavonoid glycosides of Linden. *Farma Zh* 1972; 27: 86-87.

## 15. Anexo I

### 15.1. Valoración de la actividad tóxica del extracto MeOH de *T. americana*

Con base en los antecedentes del efecto tóxico de algunos extractos provenientes de *T. americana*, decidimos realizar una valoración de la toxicidad del extracto MeOH activo como ansiolítico. En el estudio se utilizaron ratones ICR con un rango de peso de 30 a 35 g, agrupados en un número de 16 individuos por tratamiento, mantenidos a condiciones de 12 horas de luz por 12 horas de oscuridad, con alimento y agua a libre demanda. Cada animal recibió el tratamiento vía oral (vo): Agua (como control) y las dosis de 250, 500 y 1000 mg /kg del extracto MeOH. Cabe recordar que otros autores mostraron que el extracto tuvo una DL<sub>50</sub> de 375 mg/kg por vía intraperitoneal.

Los animales fueron administrados diariamente durante 2 semanas, cada día después de la administración fueron observados a los 30 min, 1, 2, 4, 6 y 24 horas para determinar si cualitativamente, presentaban alguna alteración en su comportamiento general. Se determinaron algunos parámetros (Prueba de Irwing) que reciben una evaluación de +++ Severo; ++ Moderado; + Leve; - Ausencia de síntomas (Cuadro A1):

Cuadro A1: Parámetros a observar durante la prueba de Irwing.

Parámetro a evaluar	Observaciones
Contorsiones abdominales	Depresión del SNC
Pelos erizados	Posible acción sobre SNA, por estimulación simpática a través de receptores $\beta$ -adrenérgicos
Ptosis palpebral	Signo de depresión central
Alteración en los movimientos	Un aumento indica estimulación del SNC y una disminución predice depresión del SNC
Amontonamiento	Depresión del SNC
Pérdida del tono muscular	Depresión del SNC
Tremores	Depresión del SNC
Parálisis de miembros	Depresión del SNC
Secreción salival	Posible acción sobre SNA, por estimulación simpática (receptores $\alpha$ -adrenérgicos) o parasimpática (receptores muscarínicos)
Convulsiones	Estimulación del SNC
Sedación	Depresión del SNC
Muerte	

SNA: Sistema Nervioso Autónomo  
 SNC: Sistema Nervioso Central

A las 24 horas de administración, 8 animales de cada grupo fueron anestesiados con éter etílico y se les tomó muestras de sangre. Un capilar de vidrio con heparina fue introducido en el lagrimal del ojo del ratón y la sangre así obtenida se colectó en un tubo para microcentrifuga, aproximadamente se obtuvieron de 250 a 300  $\mu$ l.

Después de las dos semanas de tratamiento, los animales restantes fueron sometidos al procedimiento para la obtención de la muestra de sangre. Los animales además fueron pesados, para comparar su masa al inicio y final del tratamiento.

La sangre obtenida fue centrifugada a 2000 rpm durante 15 minutos, el suero fue separado y almacenado a 4 °C para determinar luego la actividad de las enzimas aspartato aminotransferasa (TGO) y alanina aminotransferasa (TGP) que son un índice de alteración hepática.

#### 15.1.1. Actividad TGP

La determinación se hizo a 37 °C,  $\alpha$ -cetoglutarato que es el sustrato sufre una reacción de transaminación para producir ácido glutámico y ácido pirúvico por la acción de la enzima transaminasa glutámica pirúvica.

Esta enzima marcadora de la integridad del funcionamiento hepático se midió cuantificando la transferencia de grupos aminos de la alanina para producir glutamato. La reacción está acoplada a la reducción de piruvato, lo cual permitió seguir la reacción por la disminución de la concentración de NADH a 340 nm.



La reacción (1) esta catalizada por TGP y la (2) por Lactato deshidrogenasa

A una mezcla de reacción de 400 $\mu$ l que contiene  $\alpha$ -cetoglutarato NADH y LDH incubada a 37°C se adicionó 25 $\mu$ l de suero y se mezcló en celdas de cuarzo. Posteriormente se agitó y se siguió mediante un espectrofotómetro la desaparición de NADH a 340nm durante 180 seg. con registros cada 20 seg. La velocidad del

decaimiento de la absorbancia fue proporcional a la actividad de TGO. Los ensayos se compararon contra la velocidad obtenida con un suero patrón que contenía 37u/L.

El cálculo de TGP:

$$U/l = \Delta A / \text{min.} \times 1.740$$

U/l. Unidades internacionales por litro

$\Delta A$ . Incremento de la absorbancia con respecto al tiempo

Se utilizó una muestra de suero como estándar con una actividad de TGP conocida de 37U/L.

### 15.1.2. Actividad TGO

La TGO es otra enzima asociada a función hepática, ésta realiza la transferencia de grupos aminos del aspartato para producir oxalacetato y glutamato. Esta reacción se acopla a la reducción de oxalacetato para producir malato, con el consumo de NADH que se registra espectrofotométricamente a 340 nm.



La reacción (1) esta catalizada por TGO y la (2) por Malato deshidrogenasa

El cálculo de TGO:

$$U/l = \Delta A / \text{min.} \times 1.740$$

U/l. Unidades internacionales por litro

$\Delta A$ . Incremento de la absorbancia con respecto al tiempo

Se utilizó una muestra de suero como estándar con una actividad de TGO conocida 60 U/L.

### 15.1.3. Actividad de Creatinina

Se utilizó una solución estándar de creatinina (20 mg/L), ácido pícrico (41.4 mM) además de un reactivo alcalino (carbonato de sodio, pH= 12.7). En un baño de incubación a 37 °C, en dos celdas de cuarzo se agregaron 200 µl de reactivo de trabajo (reactivo alcalino + ácido pícrico, a volúmenes iguales). En una de las celdas se adicionaron 40 µl del suero y en la otra 40 µl del estándar de creatinina y se agitaron para proceder a la lectura de la absorbancia a los 30 segundos y 5 minutos después de incubar.

El cálculo de creatinina:  $Creatinina...mg / kg = (D2 - D1)xf$

$$f = \frac{20mg/l}{S1 - S2}$$

D1= absorbancia de la muestra con suero problema a los 30 segundos

D2= absorbancia de la muestra con suero problema a los 5 minutos

S1= absorbancia de la muestra con estándar a los 30 segundos

S2= absorbancia de la muestra con estándar a los 5 minutos

### 15.1.4. Resultados del análisis de toxicidad

El extracto metanólico de *T. americana* a las dosis administradas por vía oral no modificó los parámetros analizados



## 16. Anexo II

### 16.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La RMN es una técnica espectroscópica no destructiva que se fundamenta en las propiedades magnéticas del núcleo atómico colocado en un campo magnético externo. Los núcleos atómicos más ampliamente utilizados en términos de espectroscopia son los que contiene isótopos que poseen un número cuántico de espín de  $\frac{1}{2}$  como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$ , de los cuales  $^1\text{H}$  es el más utilizado. En la  $^1\text{H}$ -RMN se determinan "piezas" únicas valiables de un "rompecabezas", de tal forma que la información estructural es obtenida de parámetros como el desplazamiento químico ( $\delta$ , en ppm), el modelo de acoplamiento espín-espín (multiplicidad), la constante de acoplamiento (J en Hz), la integración de la señal.

La codificación de los valores del  $\delta$  químico de cada uno y de todos los protones de la molécula es información que indica la naturaleza del campo magnético y del medio ambiente químico que está experimentando cada protón. A través de las constantes de acoplamiento espín-espín y la multiplicidad de la señales.

La medición de la intensidad de la señal en el espectro de RMN permite la determinación del número de protones que contribuyen a la señal, por lo que es posible determinar el número de protones en la molécula por comparación de las intensidades relativas de la señal. Toda la información obtenida hace de la RMN una de las técnicas analíticas cualitativas de mayor riqueza de información para la caracterización de los metabolitos secundarios, a partir de plantas medicinales <sup>Ismail e Ismail, 2004\*</sup>.

\* Ismail D, Ismail IM. Chapter 17: Identification of drug metabolites in biological fluids using qualitative spectroscopic and chromatographic techniques. In: A handbook of bioanalysis and drug metabolism. Edited by Gary Evans. CRC Press, New York 2004, Pp: 310-314.

#### 16.1.1. Método para la identificación del Tilirósido proveniente de la fracción activa de *T. americana*

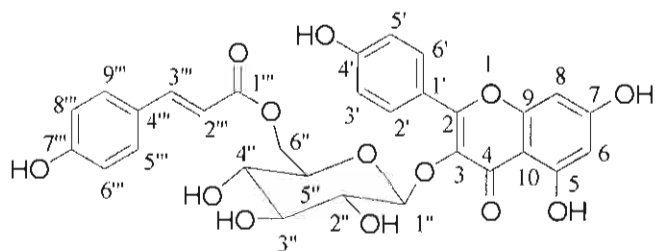
Fue necesario obtener una muestra con un alto grado de pureza para tener éxito en el análisis y elucidación estructural por  $^{13}\text{C}$ -RMN, debido a que las impurezas pueden opacar los picos relacionados a la molécula de interés.

La muestra de tilirósido fue obtenida al fraccionar de FC1, se almacenó en refrigeración a 4 °C hasta su envío para el análisis estructural, al departamento de química analítica del Centro de Investigaciones químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Se disolvieron 4 mg de la muestra en dimetilsulfóxido (DMSO).

Los espectros de RMN se obtuvieron a 200 MHz, en un espectrometro de RMN multinuclear (Varian ®, Inova), se utilizó cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y como referencia interna tetrametilsilano.

#### 16.1.2. Resultados

El análisis de la señales permitió identificar la muestra como TILIRÓSIDO, cuyos datos espectroscópicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  se muestra en el cuadro AII, donde se realizó una comparación entre los datos de RMN teóricos y experimentales. Los datos teóricos fueron obtenidos utilizando el programa *ACD/Labs software for NMR Spectroscopy*, versión 5.0.



**Cuadro AII.** Valores del espectro de RMN para tilirósido

Carbono	RMN Teórico	RMN experimental
C2	156.8	156.2
C3	133.7	132.9
C4	177.6	177.2
C5	160	159.8
C6	97.6	98
C7	164	164.09
C8	93.4	93
C9	158	156.3
C10	103.9	103.8
C1'	121	120.69
C2'	130.6	130.7
C3'	115.4	115.0
C4'	160	156.2
C5'	115.4	115.0
C6'	130.6	130.0
C1''	101.8	101.5
C''	74.6	74.1
C''	76.7	76.2
C''	70.5	69.9
C''	74.6	74.2
C6''	63.5	62.9
C1'''	165	166.03
C2	113.9	113.5
C3	144.8	144.5
C4	125.2	124.8
C5	130.6	130.7
C6	116.0	115.6
C7'''	160	161.0
C8'''	116.0	115.6
C9'''	130.6	130.7

## 17. Anexo III

### 17.1. Actividad ansiogénica de PTX en el LEC

#### 17.1.1. Animales y diseño experimental

Se utilizaron ratones macho de la cepa ICR (30-35 g), bajo condiciones estándares laboratorio ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 12 hrs de luz por 12 hrs de oscuridad), con acceso libre al agua y alimento.

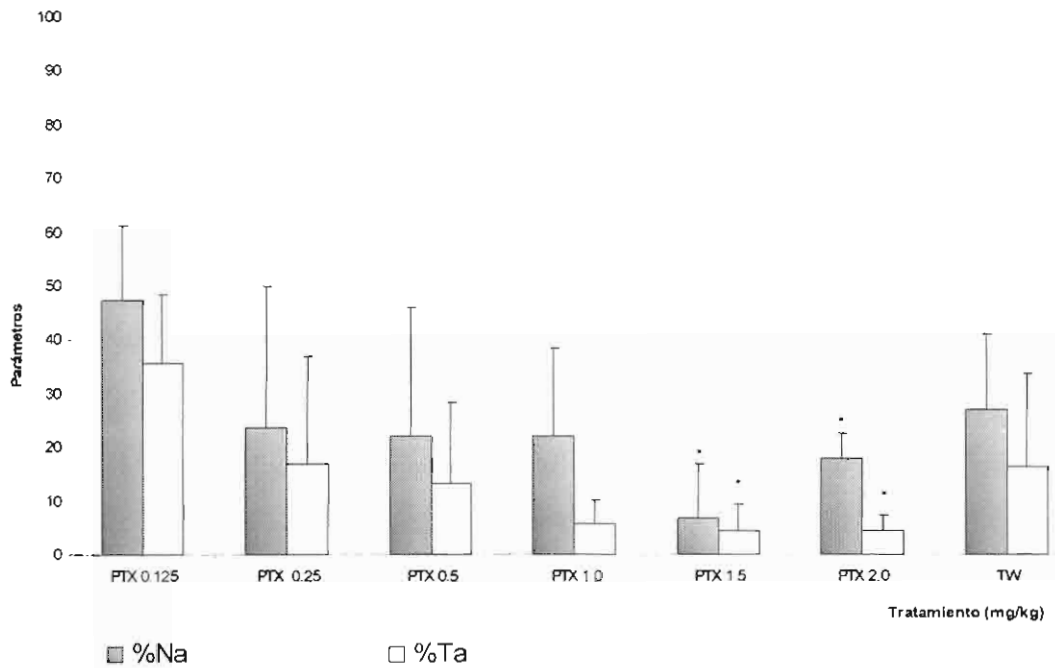
Se formaron grupos de 7 ratones cada uno, los cuales recibieron las dosis vía ip de 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/kg de Picrotoxina (diluida en una solución de Tween 20 al 1 %). Treinta minutos después fueron sometidos al ensayo del LEC y los parámetros analizados fueron % Na (porcentaje del número de cruces que los ratones realizan en los brazos abiertos del LEC), % Ta (porcentaje del tiempo que los animales permanecen en los brazos abiertos del LEC). También se analizaron los parámetros etológicos asociados a la prueba, como son:

- a) Número de estiramientos verticales (EV, Rearing, en inglés) los cuales son comúnmente observados cuando los ratones están dentro de los brazos cerrados del LEC.
- b) Número de estiramientos horizontales (EH, Sapping, en inglés).
- c) Número de veces que se asoma hacia el piso (A, Head dipping, en inglés), observados principalmente cuando los ratones están en los brazos abiertos del LEC.

#### 17.1.2. Resultados

Los datos obtenidos con la administración de la dosis de 1.0 y menores, indican que la PTX no induce un cambio significativo con respecto al vehículo en los parámetros de % Na y % Ta. Sin embargo, las dosis de 1.5 y 2.0 mg/kg son capaces de disminuir significativamente dichos parámetros ( $p < 0.05$ , Figura AIII).

Además, el comportamiento de los animales en el LEC también se ve modificado al administrar las dosis altas de PTX. Se observa que los EV, EH y las A son significativamente ( $p < 0.05$ ) menores en los tratamientos con 1.5 y 2.0 mg/kg cuando se comparan con el grupo control (Cuadro AII)



**Fig. AIII.** Porcentaje de entradas y de tiempo que ratones gastan en LEC con la administración ip de picotoxina (PTX). TW= solución Tween 20 al 1%, %Na= porcentaje del número de cruces en brazos abiertos, %Ta= porcentaje de tiempo en brazos abiertos. ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ .

**Cuadro AIII.** Evaluación de PTX sobre algunos parámetros etológicos en el LEC

Tratamiento PTX (mg/kg)	EV	EH	A
0.125	23.5 ±10.1	51.0 ±8.6	25.3 ±5.4
0.25	23.8 ±8.4	49.7 ±7.3	21.3 ±9.0
0.5	10.8 ±9.4*	32.3 ±13.6	14.0 ±10.8
1.0	8.2 ±3.4*	22.0 ±10.6*	9.5 ±6.2*
1.5	3.7 ±3.3*	18.3 ±13.3*	8.8 ±8.9*
2.0	3.7 ±4.0*	17.2 ±10.3*	6.2 ±4.0*
Veh	24.0 ±4.9	57.2 ±9.5	30.2 ±15.1

ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* $p < 0.05$ . Promedio ± DE (desviación estándar)  
EV= Estiramientos Verticales, EH= Estiramientos Horizontales, A= Asomadas



## Flavonoids from *Tilia americana* with anxiolytic activity in plus-maze test

Maribel Herrera-Ruiz<sup>a,b,\*</sup>, Rubén Román-Ramos<sup>b</sup>, Alejandro Zamilpa<sup>a</sup>,  
Jaime Tortoriello<sup>a</sup>, J. Enrique Jiménez-Ferrer<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Argentina 1, 62790 Xochitepec, Morelos, Mexico

<sup>b</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas, Laboratorio de Farmacología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) Mexico City, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 January 2008

Received in revised form 19 March 2008

Accepted 21 April 2008

Available online 24 April 2008

#### Keywords:

*Tilia americana*

Elevated plus-maze

Flavonoids

Tiliroside

### ABSTRACT

The aerial parts of *Tilia americana* var. *mexicana* (Schltdl) Hardin (Tiliaceae) have been widely used in Mexican traditional medicine to relieve sleeplessness, headache, and nervous excitement. The anxiolytic effect of four extracts and several flavonoid fractions from the bracts of *Tilia americana* subsp. *mexicana*, var. *mexicana* (Schltdl) Hardin or *Tilia mexicana* (Tiliaceae) was studied. Administration of 100 mg/kg of *n*-hexane, ethyl acetate, and aqueous extracts to elevated plus-maze (EPM)-exposed mice displayed no anxiolytic effect; however, identical doses of methanol extract was able to increase the time percentage that mice spent in the EPM's open arms, as well as the percentage of crossings in the EPM's arms. The dose–response curve produced by methanol extract showed anxiolytic activity since 25 mg/kg; animals showed no motor activity alteration in the open field test (OFT). Methanol extract was subjected to a bioassay-guided fractionation to obtain four ascendant polarity fractions (F1–F4) which were administered at 100 mg/kg. Data results indicate that F1 displayed the main anxiolytic effect. The purification of F1 produced a rich flavonoid anxiolytic mixture (F1C). This fraction was purified by RP-18 open chromatographic column to obtain four polar descent fractions: F1C<sub>1</sub>, F1C<sub>2</sub>, F1C<sub>3</sub>, and F1C<sub>4</sub>, respectively. Tiliroside was the major ingredient from the active fraction. High performance liquid chromatography analysis indicated that F1C was constituted principally of tiliroside, quercetin, quercitrin, kaempferol, and their glycosides. These results supported the use of *Tilia americana* in Mexican traditional medicine as well as the anxiolytic effect of a rich flavonoid fraction without affect motor activity.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

There is a high prevalence of mental and neurological disorders worldwide; these account for 13% of total disability adjusted life years (DALYs) lost due to all diseases and injuries in the world (WHO, 2004). WHO estimates that 450 million persons suffer from mental illness (WHO, 2001). Anxiety is widespread, with lifetime prevalence rates ranging from 13.6 to 28.8% in Western countries. Individuals aged between 10 and 25 years are at highest risk for developing an anxiety condition. These conditions are among the most common mental diseases, and their prevalence and disease course are reasonably well documented (Michael et al., 2007). On the other hand, WHO launched its first-ever comprehensive traditional medicine strategy in 2002 (WHO, 2002) with the objective of recognizing traditional medicine in the treatment of public health problems.

*Tilia americana* subsp. *mexicana*, var. *mexicana* (Schltdl) Hardin (Tiliaceae), popularly known as *cirimbo*, *sirimo*, *tila de bolito*, *Tsirimu*, *Tilo*, – is a tree with smooth cortex and a height of nearly 18 m – (Argueta et al., 1994; Bello, 1993; Martínez, 1987). The aerial parts of this species have been used in Mexican traditional medicine for treating nervous disorders, insomnia, and headache. The flowers and fruits are used to treat colon spasm, menstrual irregularities, as an emollient, and for rheumatism (Argueta et al., 1994). Scientific reports have shown that central nervous system (CNS) activity produced by *Tilia* species, *Tilia europea*, and *Tilio tomentosa* induced significantly increased time spent by mice into the elevated plus-maze's (EPM's) open arms (Coleta et al., 2001; Viola et al., 1994). These results indicated that *Tilia americana* could have different actions on nervous system.

Previous phytochemical studies indicated that *Tilia* genus contains high levels of glycosidic flavonoids and their aglycons (Zub, 1972). These compounds were responsible for the hepatoprotective effect of *Tilia orgentea*, such as the following: kaempferol 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside-6''-*p*-coumaril ester (Tiliroside); kaempferol 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside (astragalin), and quercetin 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside (isoquercitrin), which were more active than quercetin 3-*O*- $\beta$ -rhamnopyranoside (quercitrin) and kaempferol

\* Corresponding author at: Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Argentina 1, Xochitepec, Morelos, Mexico 62790. Tel.: +52 777 361 21 55; fax: +52 777 361 21 55.

E-mail address: [cibis.herj@yahoo.com.mx](mailto:cibis.herj@yahoo.com.mx) (M. Herrera-Ruiz).

(Yesilada et al., 1997). Regarding CNS activity, kaempferol from *Tilia tomentosa* displaces [<sup>3</sup>H]FNZ (flumazenil) from its recognition binding sites, but did not display anxiolytic activity in the EPM test (Viola et al., 1994).

Some pharmacological reports concerning the biological properties of *Tilia americana* indicated that the *n*-hexanic and methanolic extracts of this species induced an anxiolytic effect in the EPM test. By means of intraperitoneal (i.p.) administration, the animals showed a decrease of spontaneous motor activity and toxic signs (Aguirre-Hernández et al., 2007a); biological effects were attributed to non-polar compounds (Aguirre-Hernández et al., 2007b). Several populations of this species gathered in the U.S. present metabolic pattern differences: species originating in southern areas contain quercetin-3-*O*-glucoside and quercetin-1,3-*O*-diglucoside, while these glycosyl flavonoids were not detected in species from northern regions (Hockok and Anway, 1972). In this work we evaluated the anxiolytic effect of *Tilia americana* (employing the EPM test); the open field test (OFT) was utilized for evaluating motor activity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

Bracts and flowers of *Tilia americana* were collected in Mexicapan, State of Mexico, Mexico. Plant material was identified by Abigail Aguilar-Contreras, M.Sc. (Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)M Herbarium, Mexico City). Voucher specimens were stored at this site for future reference (IMSSM-15099). Material was selected and dried under dark conditions at room temperature for 2 weeks. Dry material was milled in an electric grinder (Pulvex), obtaining particles of <4 mm.

### 2.2. Extraction and fractionation

#### 2.2.1. Extracts preparation

The dried and milled material (2000 g) was initially macerated with *n*-hexane (3 × 7 L). The extract was concentrated under low pressure at 50 °C. After drying, the plant material was extracted with ethylacetate (3 × 7 L). Finally, this residual vegetal was extracted with methanol (3 × 7 L) and the extract was vacuum-concentrated to produce the methanol extract. On the other hand, 400 g of dry *Tilia americana* material was extracted with an ethanol–water solution (60–40, 3 L). Extract yields were as follows: *n*-hexane, 0.88% (17.62 g); ethyl acetate, 0.55% (11.08 g); methanol, 4.87% (97.59 g); hydroalcohol, 14.8% (59.32 g).

#### 2.2.2. Fractionation of the methanol extract

Ninety grams of the methanol extract was fractionated using a liquid–liquid extraction technique with water Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution (pH 9.22) and ethyl acetate (1:1, 4 L, four times). The organic fraction (F1, 2.9 g) was collected and evaporated to dryness by low-pressure distillation. The aqueous fraction was neutralized with HCl 2.0N (pH 6.8) and partitioned with ethyl acetate to obtain a new organic fraction (F2, 1.5 g), which was collected and analyzed. The aqueous remnant was finally subjected to liquid–liquid bipartition with *n*-butanol to obtain an organic fraction (F3, 2.7 g). The aqueous phase (F4, 2.9 g) was dried. These fractions were stored at 4 °C until biological testing.

### 2.3. Chromatographic separation of F1

F1 was precipitated with *n*-hexane; the soluble part was denominated F1A. The precipitate was suspended in CHCl<sub>3</sub> to obtain a less polar fraction (F1B). Finally the solid fraction was suspended in a

mixture of CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1) to obtain a soluble fraction (F1C) and the most polar mixture (F1D). All fractions were stored at 4 °C until biological testing.

### 2.4. Purification of the anxiolytic fraction F1C

Four hundred and fifty milligrams of F1C was subjected to an RP18 open chromatography column, eluted with an acetonitrile/water gradient system at an initial proportion of 60:40. Fifty microliters of samples were collected and grouped based on spot similarities on thin layer chromatography. The acetonitrile proportion was gradually increased until 100%. Finally, only four fractions of decreasing polarity were obtained as follows: F1C<sub>1</sub> (200 mg; 40% acetonitrile); F1C<sub>2</sub> (56 mg; 60% acetonitrile); F1C<sub>3</sub> (51 mg; 80% acetonitrile), and F1C<sub>4</sub> (143 mg; 100% acetonitrile), respectively. The F1C<sub>4</sub> fraction produced a yellow amorphous precipitate (F1C<sub>4</sub>P), which was identified as tiliroside (12).

### 2.5. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis (flavonoid content)

A flavonoid chromatographic method was developed on a Waters 2595 separation module system equipped with a Waters 996 PDA detector and an empower chromatographic manager version 1 (Waters, USA). Analysis was performed with an Alltech rocket RP-18 column (3 μm × 53 mm × 3 mm). The mobile phase consisted of gradient system of acetonitrile (solvent A) and water (solvent B). The initial mixture was 15% (A) and 85% (B) during 4 min with a 1.0 mL/min flow. The concentration of solvent A was gradually increased (1 min) to 55%. This proportion was maintained for 4 min. During the next 2 min, solvent A was increased to 70%. Finally, solvent A concentration was 85%, which was maintained for 3 min; subsequently, the mobile phase was returned to initial conditions (2 min). A PhotoDiode Array (PDA) detector was used with a range of 190–600 nm; the main wavelength of the analysis was 250 nm.

Eleven commercial flavonoids (SIGMA, USA) were analyzed with this HPLC method: apigenin (95%), chrysin (97%), kaempferol (90%), quercetin (95%), quercitrin (85%), rutin (95%), hesperetin (95%), hesperidin (80%), naringin (>90), naringenin (95%) and neohesperidin (90%). Previous isolated tiliroside compound was also analyzed.

### 2.6. Drugs

Diazepam (DZP, 1.0 mg/kg, Sigma) was used as the standard anxiolytic (positive control group), and picrotoxin (PTX, 2 mg/kg, Sigma) was utilized as the anxiogenic drug. Tween 20 solution (TW, 5%, Merck) was employed to treat negative control groups.

### 2.7. Animals and treatments

Albino ICR mice weighing 30–36 g were used (Harlan, Mexico). All animals were housed eight per cage, maintained under laboratory conditions at 25 °C with a normal 12 h light/dark schedule with lights on at 07:00 a.m. and free access to water and food (pellets, Harlan Rodent Lab Diet). Mice were allowed to adapt to the laboratory environment (for at least 3 weeks) prior to experiment initiation. Experiments were carried out between 8:00 a.m. and 12:00 p.m. in an adjacent, special noise-free room with controlled illumination. All studies were performed in accordance with Official Mexican Norm NOM-062-ZOO-1999 (technical specifications for production, care, and use of laboratory animals). The experimental protocol was approved by the Institutional Research Committee (registry number R-2006-1701-6). Minimum number of animals and time of observation required to obtain consistent data were employed.

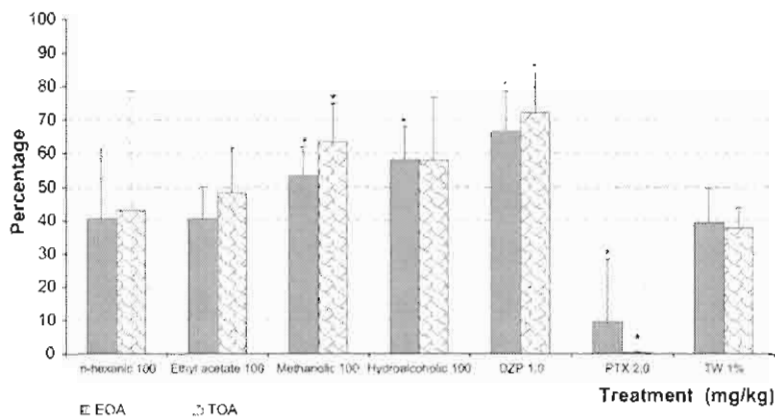


Fig. 1. Effect produced by the oral administration of different extracts from *Tilia americana* on the percentage of time spend and percentage of entries into the open arms by mice exposed to the EPM test. \* $p < 0.05$  on ANOVA followed by post hoc Dunnet test (mean  $\pm$  S.D.) DZP, diazepam; PTX, picrotoxin; TW 1%, Tween 20; EOA, Entries to open arms; TOA, time spent to open arms.

The animals were exposed to elevated plus-maze test (EPM) and open field test. Treatment groups were administered via oral pathway (PO) through an intra-gastric cannula as follows: n-hexane extract (100 mg/kg); ethyl acetate extract (100 mg/kg); methanol extract (3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 mg/kg); hydroalcohol extract (100 mg/kg). Fractions were administered in the follow-

ing manner: F1 (12.5, 50, and 100 mg/kg); F2 (100 mg/kg); F3 (100 mg/kg); F4 (100 mg/kg); F1A, F1B, F1C, and F1D were administered at 50 mg/kg. The negative control group received water or Tween 20 at 1% at 100  $\mu$ l/10 g. The anxiolytic control received diazepam (DZP) 1.0 mg/kg, while the anxiogenic group was treated with 1.0 mg/kg (picrotoxin) PTX. All treatments from *Tilia ameri-*

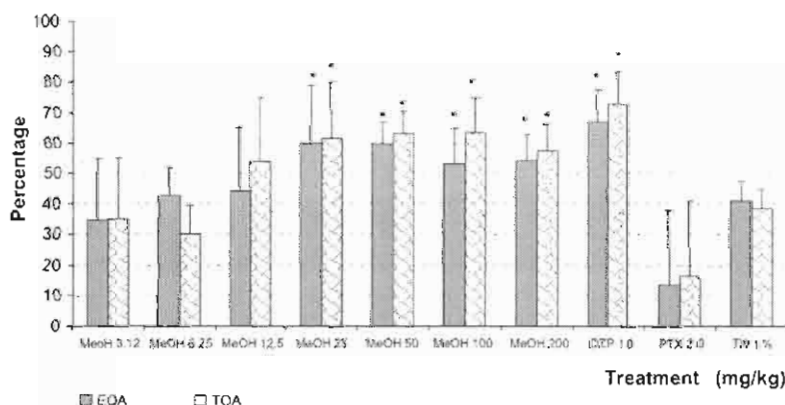


Fig. 2. Effect produced by the oral administration of different doses of Methanolic extract from *Tilia americana* on the percentage of time spend and percentage of entries into the open arms by mice exposed to the EPM test. \* $p < 0.05$  on ANOVA followed by post hoc Dunnet test (mean  $\pm$  S.D.). MeOH, methanolic extract; DZP, diazepam; PTX, picrotoxin; TW 1%, Tween 20; EOA, Entries to open arms; TOA, time spent to open arms

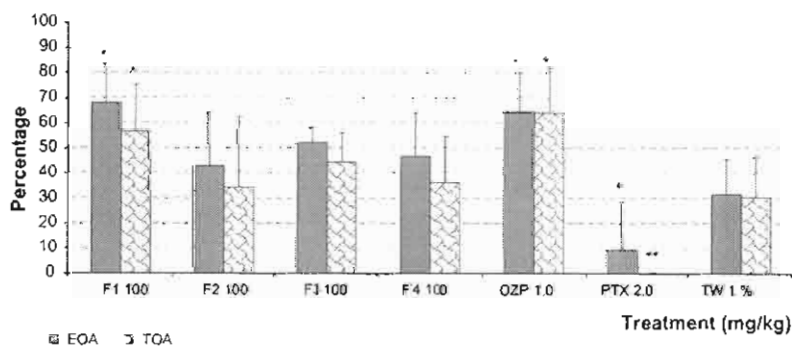


Fig. 3. Effect produced by the oral administration of different fractions from Methanolic extract of *Tilia americana* specie on the percentage of time spend and percentage of entries into the open arms by mice exposed to the EPM test. \* $p < 0.05$  on ANOVA followed by post hoc Dunnet test (mean  $\pm$  S.D.). DZP, diazepam; PTX, picrotoxin; TW 1%, Tween 20; EOA, Entries to open arms; TOA, time spent to open arms.



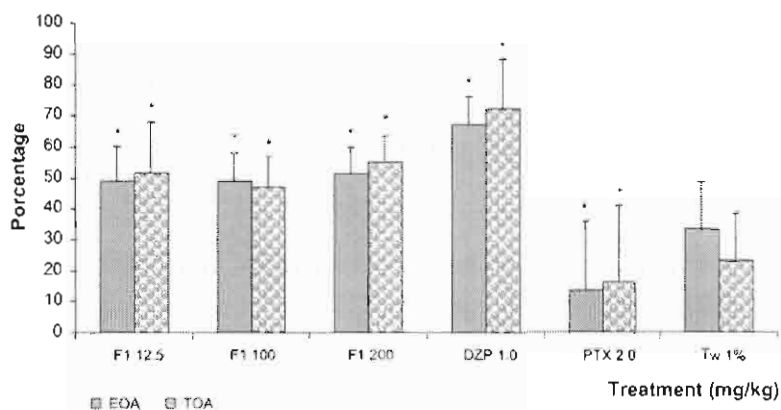


Fig. 4. Effect produced by the oral administration of different doses of F1 fraction from methanolic extract of *Tiha americana* specie on the percentage of time spend and percentage of entries into the open arms by mice exposed to the EPM test. \* $p < 0.05$  on ANOVA followed by post hoc Dunnet test (mean  $\pm$  S.D.). DZP, diazepam; PTX, picrotoxin; TW 1%, Tween 20; EOA, Entries to open arms; TOA, time spent to open arms.

cana were administered 1 h prior to exposure to EPM and the open field test, while DZP and PTX were administered 30 min prior to this test.

2.8. Elevated plus-maze (EPM)

The EPM test is the most widely used model for the anxiolytic-activity assessment of novel substances including herbal remedies (Zhang, 2004) in rodents (Pellow et al., 1985; Lister, 1987). The EPM apparatus was made of Plexiglas and consisted of two open arms (30 cm  $\times$  5 cm) and two closed arms (30 cm  $\times$  5 cm) with 25-cm thick walls. The arms extended from a central platform (5 cm  $\times$  5 cm), and the maze was elevated 38.5 cm from the room's floor.

Each animal was placed at the center of the maze facing one of the enclosed arms. Number of entries and time spent on closed and open arms were recorded for 5 min. Entry into an arm was defined as the animal placing all four paws on the arm. All tests were recorded with a video camera. After each test, the maze was carefully cleaned with tissue paper wet with a 10%

ethanol solution. The percentage of number of entries to open arms (EOA) and the percentage of time spent in open arms (TOA) were registered.

2.9. Open field test (OFT)

The open field area was constructed of Plexiglas, with transparent walls and a black floor (30 cm  $\times$  30 cm  $\times$  15 cm). It was divided into nine squares of equal area. The OFT was used to evaluate the animal's exploratory activity (Archer, 1973). Parameters observed included were number of squares crossed (with four paws) and number of rearings.

2.10. Statistical analysis

Statistical analysis of the results was carried out with a SPSS 11.0 program and was based on an analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnet test, in which a significant difference was established between groups when the  $p$ -value was  $<0.05$ .

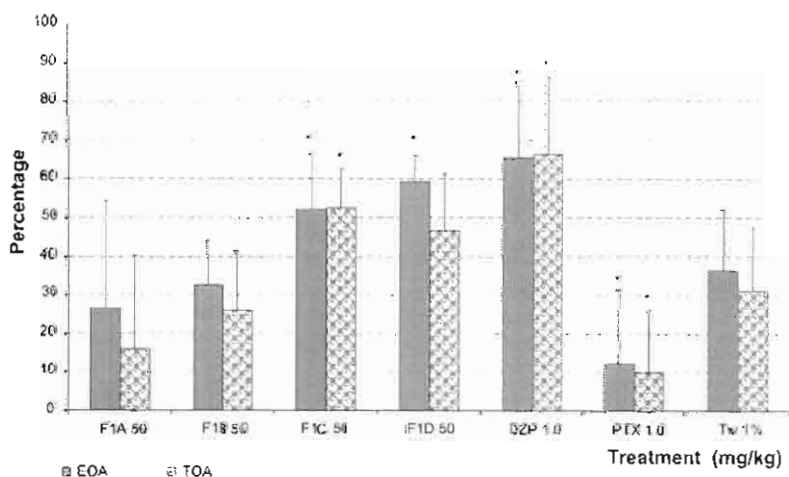
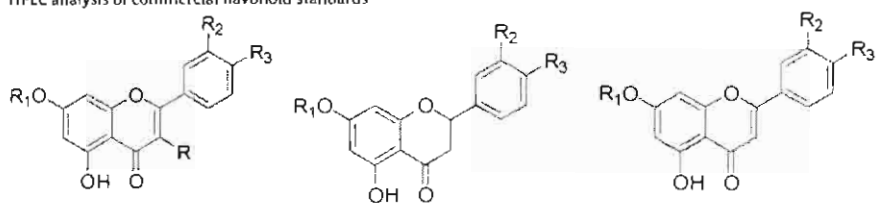


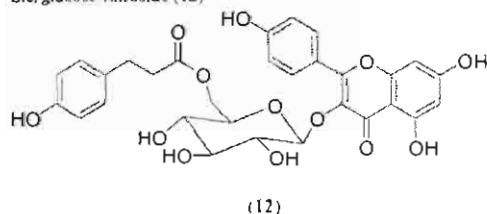
Fig. 5. Effect produced by the oral administration of different fractions from F1 of *Tiha americana* specie on the percentage of time spend and percentage of entries into the open arms by mice exposed to the EPM test. \* $p < 0.05$  on ANOVA followed by post hoc Dunnet test (mean  $\pm$  S.D.). DZP, diazepam; PTX, picrotoxin; TW 1%, Tween 20; EOA, Entries to open arms; TOA, time spent to open arms.

**Table 1**  
HPLC analysis of commercial flavonoid standards



	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	RT	λ <sub>max</sub>			
<b>FLAVONOIS</b>									
Flavonols									
Kaempferol (1)	OH	H	OH	H	7.00	197	266	364	
Quercetin (2)	OH	H	OH	OH	6.58	202	255	368	
Quercitrin (3)	O-Rha	H	OH	OH	5.54	204	255	349	
Rutin (4)	O-Glc-rha	H	OH	OH	5.10	205	256	357	
<b>FLAVANONES</b>									
Flavanones									
Hesperetin (5)		H	OH	OCH <sub>3</sub>	7.20	201	287		
Hesperidin (6)		Glc-Rha <sup>6</sup>	OH	OCH <sub>3</sub>	5.52	201	284		
Naringin (7)		Glc-Rha	H	OH	5.46	174	282		
Naringenin (8)		H	H	OH	7.01	195	282		
Neohesperidin (9)		Glc-Rha <sup>2</sup>	OH	OCH <sub>3</sub>	5.58	205	284		
<b>FLAVONES</b>									
Flavones									
Apigenin (10)		H	OH	H	6.94	199	267	334	
Chrysin (11)		H	H	H	9.08	205	268	312	

Glc, glucose; Tilioside (12)



### 3. Results

#### 3.1. Biological activity of DZP, PTX

Administration of DZP (1.0 mg/kg) significantly ( $p < 0.05$ ) increased the percentage of time mice spent in open arms (TOA) and the percentage of entries into the EPM arms (EOA), confirming an anxiolytic effect. Animals receiving PTX (1.0 mg/kg) produced significant ( $p < 0.05$ ) diminution in these parameters. These results were consistent in all assays of this work (see Figs. 1–5). On OFT, treatments did not produce behavioral change with respect to the control group. However, PTX-treated animals (1.0 mg/kg) demonstrated significant ( $p < 0.05$ ) diminution in total crossings and rearings with respect to vehicle-treated mice (data not shown).

#### 3.2. Biological activity *Tilia americana's* extracts

The 100 mg/kg dose of *n*-hexane and ethyl acetate extracts from *Tilia americana* did not induce changes with respect to control group. On the other hand, animals that received the same dose of hydroalcohol extract exhibited an increase of EOA and TOA, but solely the EOA parameter was significantly ( $p < 0.05$ ) different from that of the control group. Methanol extract (100 mg/kg) provoked a significant ( $p < 0.05$ ) increment of EOA and TOA in EPM-subjected mice (Fig. 1). None of the extracts showed effects on the OFT evidencing differences with respect to the control group (data not shown). Based on these results, the methanol extract was chemically fractionated.

Different doses of *Tilia americana* methanol extract (25, 50, 100, and 200 mg/kg) induced a significant ( $p < 0.05$ ) increase in EOA and TOA as compared with the control group in the EPM. Animals receiving lower doses showed no significant changes (Fig. 2). The same doses did not provoke significant changes in the OFT on comparison with the control negative group (data not shown).

#### 3.3. Biological activity of methanol extract fractions

All fractions (100 mg/kg) increased EOA and TOA, but only F1 induced a significant ( $p < 0.05$ ) change with respect to control group (Fig. 3).

Administration of different doses of F1 (12.5, 100, and 200 mg/kg) induced a significant ( $p < 0.05$ ) increase of EOA and TOA in mice; these effects were not dose-dependent (Fig. 4). These fractions did not modify the spontaneous motor activity in animals exposed to OFT (data not shown).

#### 3.4. Biological activity of F1 fractions

F1A, F1B, F1C and F1D were administered at doses of 50 mg/kg. The less polar fraction, F1A, induced a decrease in the percentage of EOA and TOA; nonetheless, this result was not statistically different with regard to that of the control group. F1B showed no change ( $p > 0.05$ ), while administration of F1C was able to increase ( $p < 0.05$ ) EAO and TOA significantly in comparison with control animals. It is noteworthy that this change was no different from that produced by DZP (Fig. 5). With respect to OFT, F1C slightly increased total

crossings and rearing, but these changes were not different with respect to the control group (data not shown).

HPLC analysis of the methanol extract, F1 and F1C fractions indicated the presence of several flavonoids. The main compounds identified in the most active fraction (F1C) comprised tiliroside (12), quercitrin (3), rutin (4) kaempferol (1), and quercetin (2) as shown in Table 1.

#### 4. Discussion

*Tilia americana* is a Mexican plant species that is widely used for the treatment of nervous disorders. It is usually prepared as an infusion from the plant's leaves, bracts, or flowers. In the present work, *Tilia americana* was evaluated with respect to the anxiolytic effect produced by oral administration of four different polarity extracts, as well as the fractions obtained from the active extract (methanol extract from bracts) in the EPM. In this work, oral administration of different doses (25, 50, 100, and 200 mg/kg) of a methanol extract increased EOA and TOA. Previous studies showed that i.p. administration of the plant's methanol and n-hexane extracts exhibited anxiolytic effects, but also affected motor activity (Aguirre-Hernández et al., 2007a). In the present work, oral administration of the anxiolytic extract (methanol) did not affect motor activity. Chemical separation of the active extract allowed isolation of an active fraction (F1) that exhibited anxiolytic properties. By means of chemical partitions, four fractions of ascending polarity were obtained (F1A, F1B, F1C and F1D). Among these, F1C produced the highest effect without affecting spontaneous motor activity. Thin layer chromatography (TLC) evidenced that flavonoids comprise the principal group of compounds present in the active extract. This group of compounds was also that accumulated in F1. By means of HPLC analysis, certain flavonoids were identified. From F1C, tiliroside was isolated and identified by comparison of nuclear magnetic resonance (NMR) and <sup>13</sup>C previously reported data. This compound was employed as a reference in the HPLC analytic method.

Flavonoids have recently increased in importance because they have been identified as a new type of ligand with *in vivo* anxiolytic properties. Different plant species utilized in traditional medicine have been submitted to neuropharmacological evaluation (among others, the EPM) in which sedative effects have been demonstrated (Zhang, 2004). The flavones chrysin and apigenin, obtained from medicinal plants, have shown an anxiolytic effect in rodents exposed to behavioral tests. Apparently, these compounds modulate the  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)ergic system to produce the biological effect (Salgueiro et al., 1997; Marder and Paladini, 2002). Nevertheless, there are findings indicating that behavioral effects produced by the previously mentioned flavonoids are not blocked by flumazenil, a fact that discards GABA participation in the mode of action (Zanoli et al., 2000). It has also been demonstrated that the flavonol termed kaempferol, as well as the two mentioned flavones mentioned previously, act as monoamine oxidase A and B (MAO A and B) inhibitors (Sloley et al., 2000). There are reports indicating that substances with these abilities on MAO – as in the case of phenelzine, bexloxtone, and moclobem – modulate monoamine levels in brain (serotonin, dopamine, and norepinephrine) and provoke behavioral modifications in rodents, indicating an anxiolytic effect (Griebel et al., 1997, 1998).

Chromatographic comparison of methanol extract and F1 and F1C fractions with flavonoid references confirmed that the extract contains flavonoids. The concentration of these compounds was increased in F1. Finally, only the fraction with the highest biological effect (F1C) contains this type of compounds, of which the main compounds were the following: tiliroside (12); rutin (4); quercitrin

(3); kaempferol (1); quercetin (2). Thus, we suggest that of these flavonoid mixtures are responsible for the anxiolytic effect of *Tilia americana*.

#### Acknowledgements

This investigation was partially supported by health research council of Mexican Institute of Social Security (FOFOI: R-2006-1701-6) and CONACYT grant to Herrera-Ruiz M (92241).

#### References

- Aguirre-Hernández, E., Martínez, A.L., González-Trujano, M.E., Moreno, J., Vibrans, H., Soto-Hernández, M., 2007a. Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. Mexicana in mice. *Journal Ethnopharmacology* 109, 140–145.
- Aguirre-Hernández, E., Rosas-Acevedo, H., Soto-Hernández, M., Martínez, A.L., Moreno, J., González-Trujano, M.E., 2007b. Bioactivity-guided isolation of beta-sitosterol and some fatty acids as active compounds in the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* var. Mexicana. *Planta Medica* 73, 1148–1155.
- Archer, J., 1973. Test for emotionality in rats and mice. A review. *Animal Behaviour* 21, 205–235.
- Argueta, A., Cano, L., Rodarte, M., 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana I y III. D.F. Instituto Nacional Indigenista, Mexico, 86, 175, 1337, 1355.
- Bello, G., 1993. Plantas útiles no maderables de la Sierra Purépecha. Folleto Técnico, Michoacán, México, INIFAP, 10, 115.
- Coleta, M., Campos, M.G., Cotrim, M.D., Proença da Cunha, A., 2001. Comparative evaluation of *Melissa officinalis* L., *Tilia europaea* L., *Passiflora edulis* Sims and *Hypericum perforatum* L. in the elevated plus maze anxiety test. *Pharmacopsychiatry* 34, S20–21.
- Griebel, G., Perrault, G., Sanger, D.J., 1997. Behavioural profiles of the reversible monoamine-oxidase-A inhibitors bexloxtone and moclobemide in experimental model for screening anxiolytic and anti-panic drugs. *Psychopharmacology (Berlin)* 131, 180–186.
- Griebel, G., Curet, O., Perrault, G., Sanger, D.J., 1998. Behavioral effects of phenelzine in an experimental model for screening anxiolytic and anti-panic drugs: correlation with changes in monoamine-oxidase activity and monoamine levels. *Neuropharmacology* 37, 927–935.
- Hockok, L.G., Anway, J.C., 1972. Morphological and Chemical Analysis of Geographical Variation in *Tilia* of Eastern North America. 1. *Brittonia*, pp. 2–8.
- Lister, R.G., 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92, 180–185.
- Marder, M., Paladini, A.C., 2002. GABA (A)-receptor ligands of flavonoid structure. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2, 853–867.
- Martínez, S.M., 1987. Plantas autóctonas y productos volcánicos de las inmediaciones de Morelia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo 10. Biblioteca de Científicos Nicolaitas.
- Michael, T., Zetsche, U., Margraf, J., 2007. Epidemiology of anxiety disorders. *Epidemiology and Psychopharmacology Psychiatry* 6, 136–142.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open, closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 14, 1, 49–167.
- Salgueiro, J.B., Ardenghi, P., Dias, M., Ferreira, M.B., Izquierdo, L., Medina, J.H., 1997. Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 58, 887–891.
- Sloley, B.D., Urlichuk, L.J., Morley, P., Durkin, J., Shan, J.J., Pang, P.K., Coutts, R.T., 2000. Identification of kaempferol as a monoamine oxidase inhibitor and potential neuroprotectant in extracts of *Ginkgo biloba* leaves. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 52, 451–459.
- Viola, H., Wolfman, C., Levi de Stein, M., Wasowski, C., Pena, C., Medua, J.H., Paladini, A.C., 1994. Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tomentosa* (Tiliaceae). *Journal Ethnopharmacology* 44, 47–53.
- WHO, 2002. Strategy for Traditional Medicine. WHO, Geneva.
- WHO, 2001. The World Health Report: Changing History. World Health Organization, Geneva.
- WHO, 2004. The world Health Report. In: Mental Health: New Understanding. New Hope. World Health Organization, Geneva.
- Yesilada, E., Ustun, O., Sezik, E., Takaishi, Y., Ono, Y., Honda, G., 1997. Inhibitory effects of Turkish folk remedies on inflammatory cytokines: interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Journal Ethnopharmacology* 58, 59–73.
- Zanoli, P., Avallone, R., Baraldi, M., 2000. Behavioral characterization of the flavonoids apigenin and chrysin. *FitoTerapia* 71, S117–1123.
- Zhang, Z.J., 2004. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Science* 75, 1659–1699.
- Zub, M.R., 1972. Flavonoid glycosides of Linden. *Farmatsevtichnyi Zhurnal* 27, 86–87.