



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

---

## Centro de Desarrollo de Productos Bióticos

Departamento de Biotecnología

Efecto antidepresivo y caracterización química de extractos de hojas de plantas silvestres y cultivadas en condiciones de invernadero de *Tilia americana* var. *mexicana*

### T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS EN DESARROLLO DE PRODUCTOS  
BIÓTICOS

P R E S E N T A:

BIOL. DANTE AVILÉS MONTES

DIRECTORAS:  
DRA. KALINA BERMÚDEZ TORRES  
DRA. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ



Yautepec, Morelos, Diciembre de 2008

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Cultivo de Células Vegetales del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional (CeProBi-IPN) y en el laboratorio de Farmacología del Centro de Investigación Biomédica del Sur del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIS-IMSS) bajo la dirección de la Dra. Kalina Bermúdez Torres y la Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz.

Para la realización de los estudios de maestría, el sustentante contó con el apoyo económico de las becas: CONACyT (216876), Beca-Tesis IPN Institucional (B061643), Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI: 20070835, 20080241).



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-14

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de Yautepec, Mor. siendo las 11:00 horas del día 19 del mes de Noviembre del 2008 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CeProBi-IPN para examinar la tesis de grado titulada:

Efecto antidepresivo y caracterización química de extractos de hojas de plantas silvestres y cultivadas en condiciones de invernadero de *Tilia americana* var. *mexicana*

Presentada por el alumno:

Avilés Apellido paterno	Montes Apellido materno	Dante Nombre(s)
		Con registro: B 0 6 1 6 4 3

aspirante de: Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directora de tesis

Dra. Kalina Bermúdez Torres

Directora de tesis

Dra. Maribel Lucía Herrera Ruiz

Dra. Elsa Ventura Zapata

Dra. Gabriela Trejo Tapia

Dra. Alma Leticia Martínez Ayala

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Adrián G. Quintero Gutiérrez



SEP IPN  
 CENTRO DE DESARROLLO  
 DE PRODUCTOS BIÓTICOS  
 YAUTEPEC, MOR.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS**

El que suscribe **Biol. Dante Avilés Montes** alumno del Programa de **Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos** con número de registro **B061643**, adscrito al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, manifiesta ser autor intelectual del presente trabajo de Tesis, el cual fue llevado a cabo bajo la dirección de la **Dra. Kalina Bermúdez Torres** (CeProBi-IPN) y de la **Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz** (CIBIS-IMSS).

Asimismo, siendo el día 09 del mes Diciembre del año 2008, en la Ciudad de Yautepec, Morelos, cedo al **Instituto Politécnico Nacional** y al **Instituto Mexicano del Seguro Social** los derechos de la presente Tesis titulada "**Efecto antidepressivo y caracterización química de extractos de hojas de plantas silvestres y cultivadas en condiciones de invernadero de *Tilia americana* var. *mexicana***" exclusivamente con fines de difusión, de investigación y académicos.

Conforme lo convenido legalmente por ambas instituciones, los interesados en usar la información contenida en el presente trabajo, no deberán reproducir de manera total o parcial, el contenido textual, de gráficas, de cuadros, de imágenes o de datos del mismo sin el consentimiento expreso previo del autor y/o directoras del trabajo y/o representantes legales de ambas instituciones. Dicho permiso puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones:

**Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, carretera Yautepec-Jojutla. Km. 8.5. Col. San Isidro, C. P. 62731 Yautepec, Morelos, (México). Teléfonos 01 (55) 57296000, ext. 82520. y 01 (735) 3941896.**

**Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS), Argentina No.1, C. P. 62790, Xochitepec, Morelos, (México). Teléfonos 01 (777) 3612155 y 01 (777) 3612194.**

Cabe destacar que de ser otorgado el permiso, el usuario a su vez contrae la obligatoriedad de otorgar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del trabajo.

**A T E N T A M E N T E**

Biol. Dante Avilés Montes

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Con base en el artículo 57 fracción I del Reglamento de Estudios de Posgrado vigente y en la Sección IV del Código de Ética del IPN, hacemos constar que el trabajo de tesis "Efecto antidepresivo y caracterización química de extractos de hojas de plantas silvestres y cultivadas en condiciones de invernadero de *Tilia americana* var. *mexicana*" es responsabilidad de la C. Dra. Kalina Bermúdez Torres, de la C. Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz y del C. Biol. Dante Avilés Montes, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

Yautepec, Morelos, a 09 de Diciembre del 2008

ATENTAMENTE

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Kalina Bermúdez Torres  
Directora de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz  
Directora de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Biol. Dante Avilés Montes  
Estudiante

***A mis padres, Judith y Juan***

***A mis hermanos, Cesar y Jair***

***A mi abuelita "Nelly"***

***A mi compañera en la vida, Arely***

Les dedico este trabajo de tesis porque ustedes forman parte importante de mi vida y de lo que soy como persona; he sacrificado mucho tiempo al no estar con ustedes por seguir uno de mis sueños en la vida que es el convertirme en un investigador científico. Gracias por apoyarme, comprenderme y darme aliento, lucho día a día para que se sientan orgullosos de mi y de lo que soy.

## AGRADECIMIENTOS

- Al comité revisor y jurado de tesis integrado por: Dra. Kalina Bermúdez Torres, Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz, Dra. Elsa Ventura Zapata, Dra. Gabriela Trejo Tapia, Dr. Mario Rodríguez Monroy; por sus valiosas sugerencias, aportaciones en mi trabajo y su contribución en mi formación académica y profesional.
- A la Dra. Kalina Bermúdez Torres; por aventurarse conmigo en este proyecto que al final nos ha dejado un buen sabor de boca, gracias por brindarme su apoyo, confianza, paciencia, consejos, amistad, orientación y por transmitirme siempre buena vibra con su sonrisa y buena disposición en todo.
- A la Dra. Elsa Ventura Zapata; por su apoyo, confianza, orientación y por su disposición en enseñarme el menester del cultivo de tejidos vegetales, que implicó un gran reto y un interesante episodio en mi formación profesional y en el desarrollo de este trabajo de investigación.
- A la Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz (con cariño, Mary); por mantener la confianza en mí (aún después de ya tanto tiempo), por permitirme ser tu alumno, por enseñarme no solo la farmacología del sistema nervioso central sino que en la vida la dedicación, empeño y esfuerzo constante son la clave para conseguir el éxito. Mary te quiero y admiro mucho.
- Al Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer (con cariño, "Profe"); por brindarme su apoyo a lo largo de estos años, por depositar en mí su confianza, por darme sus consejos y aliento, por ser un mentor. Profe le quiero y admiro mucho.
- Al Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez por ayudarme con la parte de fitoquímica, por dedicarme parte de su valioso tiempo, compartir conmigo su experiencia y por darme asesoría sin tener la necesidad de hacerlo. Además de brindarme su apoyo y amistad
- Al Dr. Manases González Cortazar; por ayudarme en la parte de fitoquímica brindándome su asesoría y resolviendo mis dudas. Por brindarme sus consejos, apoyo y amistad.
- A todos mis compañeros estudiantes y amigos del CeProBi-IPN y CIBIS-IMSS; por compartir la vida conmigo, me llevo en mi memoria y corazón grandes experiencias de vida, muy gratos momentos. El compartir con ustedes tantas cosas me ha hecho crecer como persona, de todos aprendí muchas cosas. Les quiero.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>2</b>
2.1 Trastornos del sistema nervioso central	2
2.2 Depresión	2
2.2.1 Clasificación de la depresión	3
2.2.1.1 Trastorno distímico	3
2.2.1.2 Trastorno bipolar	3
2.2.1.3 Trastorno depresivo mayor	3
2.2.2 Fisiopatología de la depresión	4
2.2.3 Tratamiento de la depresión	6
2.3 La familia Tiliaceae	10
2.3.1 Aspectos químicos	10
2.3.2 <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i>	12
2.3.2.1 Usos de tila en México y su situación ecológica	15
2.3.2.2 Aspectos farmacológicos	15
2.4 Modelos animales de desordenes psiquiátricos	16
2.4.1 Modelo de natación forzada	17
2.4.2 Modelos de actividad locomotora	18
2.4.2.1 Modelo de campo-abierto	18



2.5 Investigación fitoquímica	18
2.5.1 Cromatografía en capa fina (CCF)	21
2.5.2 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	21
2.5.2.1 Identificación de flavonoides con espectroscopía ultra violeta (UV)	22
2.5.3 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)	22
<b>3. Planteamiento del problema</b>	<b>24</b>
<b>4. Hipótesis</b>	<b>25</b>
<b>5. Objetivo general</b>	<b>25</b>
<b>6. Objetivos particulares</b>	<b>25</b>
<b>7. Materiales y métodos</b>	<b>26</b>
7.1 Materiales	27
7.1.1 Material vegetal	27
7.1.1.1 Colecta de hojas	27
7.1.1.2 Colecta de esquejes	27
7.1.2 Animales para experimentación	28
7.1.3 Fármacos de referencia	28
7.2 Métodos	28
7.2.1 Cultivos de esquejes bajo condiciones de invernadero	28
7.2.1.1 Esquejes	28
7.2.2 Obtención de extractos y análisis químico	30
7.2.3 Obtención del extracto hidroalcohólico ( <b>HA-hs, HA-hp</b> )	31
7.2.4 Fraccionamiento del extracto hidroalcohólico (HA-hs)	31
7.2.4.1 Fraccionamiento de FA	31
7.2.4.2 Fraccionamiento de FA-2	32
7.2.5 Cromatografía en capa fina	32

7.2.6 Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia	33
7.2.7 Elucidación estructural mediante resonancia magnética nuclear	35
7.2.8 Métodos de farmacología	35
7.2.8.1 Diseño experimental	35
7.2.8.2 Pruebas farmacológicas	36
7.2.8.2.1 Natación forzada (NF)	36
7.2.8.2.2 Campo abierto (CA)	36
7.3 Análisis estadístico	37
<b>8. Resultados</b>	<b>38</b>
8.1 Cultivo en invernadero	38
8.2 Obtención de extractos y análisis químico	40
8.2.1 Análisis por cromatografía en capa fina	40
8.2.2 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia	45
8.2.3 Análisis por resonancia magnética nuclear	49
8.3 Resultados de pruebas farmacológicas	50
8.3.1 Natación forzada	50
8.3.2 Campo abierto	52
<b>9. Discusión</b>	<b>54</b>
<b>10. Conclusiones</b>	<b>59</b>
<b>11. Perspectivas</b>	<b>60</b>
<b>12. Bibliografía</b>	<b>61</b>
<b>13. Anexos</b>	<b>68</b>

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Fármacos empleados en el tratamiento de la depresión	7
Tabla 2.	Terapias contra la depresión	8
Tabla 3.	Plantas con actividad antidepresiva	9
Tabla 4.	Compuestos aislados de plantas del género <i>Tilia</i>	11
Tabla 5.	Actividad farmacológica de diferentes extractos y sus fracciones de <i>T. americana</i> var. <i>mexicana</i>	15
Tabla 6.	Fraccionamiento de la fracción FA-2 proveniente de HA-hs	32
Tabla 7.	Sistema de elución empleado en HPLC para analizar las muestras	33
Tabla 8.	Estructura química de los estándares de flavonoides comerciales y tilirósido aislado de brácteas de <i>T. americana</i> var. <i>mexicana</i>	34
Tabla 9.	Tratamientos evaluados en las pruebas farmacológicas	35
Tabla 10.	Resultados obtenidos en la propagación de tila en invernadero	38
Tabla 11.	Resultados obtenidos en el enraizamiento de esquejes cultivados condiciones de invernadero	39
Tabla 12.	Rendimiento del extracto hidroalcohólico y sus fracciones	40
Tabla 13.	Rendimiento obtenido de las fracciones colectadas por cromatografía en columna a partir de 6.6 g de FA-2	44
Tabla 14.	Datos químicos obtenidos por HPLC de flavonoides usados como estándares	45
Tabla 15.	Análisis del extracto HA-hs, por HPLC	45
Tabla 16.	Análisis de FA proveniente de HA-hs, por HPLC	46
Tabla 17.	Análisis de FA-2 obtenida a partir de FA, por HPLC	46
Tabla 18.	Análisis por HPLC de la fracción I proveniente de FA-2	47
Tabla 19.	Análisis por HPLC de la fracción KL proveniente de FA-2	47
Tabla 20.	Datos químicos del extracto HA-hp obtenidos por HPLC	48
Tabla 21.	Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de $^{13}\text{C}$ RMN del glucósido de quercetina	50
Tabla 22.	Resultados en la prueba de NF de diferentes fracciones provenientes de FA-2	52

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1.	<i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> , colectada en Mexicapa, Estado de México	13
Figura 2.	Distribución en México de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i>	14
Figura 3.	Ratón expuesto a la prueba de natación forzada	17
Figura 4.	Ratón en la prueba de campo-abierto	18
Figura 5.	Diagrama general del estudio de plantas medicinales	20
Figura 6.	Diferentes etapas realizadas durante el desarrollo experimental	26
Figura 7.	Esquejes de <i>T. americana</i> acoplados a un microclima	29
Figura 8.	Estrategia experimental del estudio fitoquímico	30
Figura 9.	Aparición de brotes bajo condiciones controladas del tratamiento 2	39
Figura 10.	Hojas de obtenidas en cultivo en invernadero	39
Figura 11.	CCF de fracciones del extracto HA-hs	41
Figura 12.	CCF de la fracción FA-2	42
Figura 13.	CCF de la fracción 15p proveniente de FA-2	42
Figura 14.	CCF de la reagrupación de 50 fracciones obtenidas a partir de la fracción FA-2	44
Figura 15.	CCF del ácido ursólico a partir de la reunión B	44
Figura 16.	Perfil cromatográfico de HPLC del extracto HA-hs	46
Figura 17.	Perfil cromatográfico de HPLC del extracto HA-hp	49
Figura 18.	Comparación del perfil cromatográfico de HPLC entre a) HA-hs y b) HA-hp	50
Figura 19.	Tiempo de inmovilidad de ratones ICR en la prueba de NF	53
Figura 20.	Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad motora espontánea en ratones ICR expuestos a la prueba de campo abierto	54

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

$\delta$	Desplazamiento químico
$\lambda$	Longitud de onda
$\lambda_{max}$	Longitud de onda máxima
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
AcOEt	Acetato de etilo
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza del inglés " <i>analysis of variance</i> "
Aqu	Acuoso
CA	Campo abierto
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CeSO <sub>4</sub>	Sulfato cérico
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CMC	Carboximetilcelulosa
CTRL	Control
DA	Dopamina
DSM	Manual de diagnóstico y estadística de trastornos mentales
EtOH	Etanol
GABA	ácido $\gamma$ -amino butírico
GABAA	Receptor de GABA el cual está acoplado a un canal de cloruro
GABAB	Receptor de GABA acoplado a canales de calcio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HA	Extracto hidroalcohólico
HA-hp	Extracto hidroalcohólico de hojas de plantas cultivadas en invernadero
HA-hs	Extracto hidroalcohólico de hojas de plantas silvestre
Hex	Hexano, hexánico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HR	Humedad relativa
ICR	Cepa de ratones albinos certificada
IMI	Imipramina
ip	Intra peritoneal
LEC	Laberinto elevado en forma de cruz
MAO-A	Monoamino oxidasa-A
MAO-B	Monoamino oxidasa-B
MeOH	Metanol
msnm	Metros sobre el nivel del mar
Nm	nanometros
NE	Norepinefrina
NF	Natación forzada
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
SC	Suspensión por la cola
SER	Serotonina
SNC	Sistema nervioso central
T	Tratamiento

Til	Tilirósido
$t_R$	Tiempo de retención
UV	Ultra violeta
vo	Vía oral

---

## RESUMEN

Las flores y las brácteas de tila (*T. americana* var. *mexicana*) son tomadas en infusión en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de los trastornos nerviosos. Además, se han comprobado en modelos animales los efectos sedante, antiepiléptico, ansiolítico y antidepresivo de extractos de las brácteas. Sin embargo, el uso desmedido de las brácteas, en donde se encuentra el fruto y las semillas, limita la propagación sexual, disminuyendo drásticamente el número de semillas disponibles para tal efecto. El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar mediante un estudio fitoquímico y farmacológico la posibilidad de obtener de las hojas de tila compuestos químicos con actividad antidepresiva, para lo cual se emplearon hojas silvestres y obtenidas en condiciones de invernadero a partir de esquejes. En primer lugar, se estableció un método para la obtención de material vegetal de tila a partir de esquejes cultivados en condiciones de invernadero. Por medio de un método de HPLC, se llevó a cabo la identificación de compuestos químicos presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas, a través de la evaluación del tiempo de retención y espectro de absorción de diferentes flavonoides comerciales utilizados como estándares. Se observó que el extracto hidroalcohólico proveniente de hojas de plantas silvestres (HA-hs) tienen un alto contenido de flavonoides, entre los que se identificó a la rutina y al tilirósido, la primera con una gran abundancia. Posteriormente, se realizó la separación química del extracto, identificándose en la fracción I al flavonoide tilirósido y en la fracción KL a rutina y tilirósido. El extracto hidroalcohólico de hojas provenientes de cultivo de esquejes en invernadero (HA-hp) presentó también flavonoides. Se identificó al tilirósido, del cual se observó un pico mayor en comparación al mostrado en el análisis de HA-hs. Finalmente, se realizó un estudio farmacológico del efecto antidepresivo del extracto hidroalcohólico (HA-hs, HA-hp) y las fracciones obtenidas. Se observó que la dosis de 200 mg/kg vía oral de FA-2 y algunas de sus fracciones presentaron efecto antidepresivo en el modelo de natación forzada. Ninguno de los tratamientos modificó la actividad motora espontánea de los animales expuestos al modelo de campo abierto. El presente trabajo representa un avance importante en el estudio de tila y específicamente de la fracción FA-2

proveniente de hojas, ya que permite proponerla como una fuente de sustancias bioactivas, candidata en el desarrollo de un fitomedicamento contra trastornos de depresión.



**ABSTRACT**

In Mexican traditional medicine, flowers and bracts of tila (*Tilia americana* var. *mexicana*) are drunk as infusion for treatment of nervous disorders. Besides, the sedative, antiepileptic, anxiolytic and antidepressant effects of bracts have been confirmed on animal models. However, excessive use of bracts, where the fruit and seeds are present, limits the sexual propagation, diminishing drastically the number of available seeds. The goal of the present work was to evaluate, by the way of a phytochemical and pharmacological study, the feasibility to obtain from leaves of wild tilia plants, chemical compounds with antidepressant activity. Leaves of wild plants and those obtained under greenhouse conditions were tested. Firstly, a method was established, to obtain vegetal material of tila from cuttings cultivated in greenhouse. Using HPLC, the identification of chemical compounds present in the hydroalcoholic extract of leaves was carried out, by comparing retention time and absorption spectrum with different commercial flavonoids used as standards. Hydroalcoholic extract from leaves of wild plants (HA-hs) presents high flavonoid content, among these rutin and tilirosid were identified; the first one in great abundance. Subsequently, the chemical separation of the extract was carried out, the tilirosid was found in the fraction I and, rutin and tilirosid in the fraction KL. The hydroalcoholic extract of leaves, obtained from cuttings cultivated in greenhouse (HA-hp), showed also flavonoids. Tilirosid was identified as a greater peak in comparison with that observed for the HA-hs. Finally, a pharmacological study of the antidepressant effect of the hydroalcoholic extract (HA-hs, HA-hp) and its obtained fractions was carried out. The result showed that 200 mg/kg PO of FA-2 and some of its fractions had antidepressant effect in the swimming forced test. Any treatment modified the spontaneous motor activity of mice exposed to the open field test. The present work represents an important success in the study of tila and specifically of the FA-2 fraction from leaves, since it allowed to propose it as a source of bioactive substances, candidate in the development of a phytomedicine against depressive disorders.

## 1. Introducción

La depresión es uno de los trastornos psiquiátricos más comunes y la causa número uno de discapacidad a nivel mundial. En México, la depresión ocupa el quinto lugar dentro de las enfermedades más incapacitantes. La prevalencia de la depresión en mujeres es, aproximadamente lo doble de la observada en hombres. En el tratamiento de la depresión se emplean diversos grupos de fármacos con eficacia terapéutica demostrada, tales como los antidepresivos tricíclicos, los fármacos inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y noradrenalina, inhibidores de la monoamino oxidasa (MAO), inhibidores reversibles de la MAO-A y los antidepresivos atípicos. Varios de los medicamentos antidepresivos empleados en la clínica tienen el inconveniente de que el efecto farmacológico se presenta después de un uso crónico; además, a lo largo de su empleo producen efectos secundarios tales como ganancia de peso, disfunción sexual, desequilibrio cognitivo y en los patrones del sueño, muchos pacientes intentan suicidarse en más de una ocasión. Debido a la presencia de estos efectos secundarios indeseados, los pacientes interrumpen el tratamiento farmacológico. Ante tal situación mucha gente recurre al empleo de terapias alternativas. La herbolaria ha sido empleada ampliamente para combatir estos trastornos. Durante muchos años, en México se ha bebido una infusión de las brácteas de una planta comúnmente conocida como tila para aliviar trastornos nerviosos. En la literatura científica se encuentra reportado que tila tiene compuestos que presentan efecto ansiolítico, efecto sedante, efecto hipnótico y efecto antidepresivo, los cuales se han probado en diferentes modelos farmacológicos, demostrándose su efecto depresor del sistema nervioso central. Estos resultados avalan el uso de tila en la medicina tradicional mexicana. Pero el uso desmedido de las brácteas, en donde se encuentra el fruto y por tanto las semillas, es un factor que limita la propagación sexual, disminuyendo drásticamente el número de semillas disponibles para tal efecto. De tal manera que el objetivo del presente trabajo fue evaluar farmacológica y químicamente los extractos de hojas de *T. americana* var. *mexicana* silvestre y cultivada en invernadero, para proponer una alternativa efectiva y viable para el desarrollo de un fitomedicamento puesto que la tila está catalogada en la NOM-ECOL-059-2001 como una especie en peligro de extinción.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Alteraciones del sistema nervioso central

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) cerca de 450 millones de personas sufren de un desorden mental o conductual. Los trastornos mentales tienen un gran impacto sobre la vida de las personas que las padecen, su familia y la sociedad en su conjunto. Se calcula que más del 20% de la población mundial padecerá algún trastorno afectivo que requiere tratamiento farmacológico en algún momento de su vida ([Remik, 2002](#)). Las causas más comunes de las discapacidades en esta área son desórdenes neuropsiquiátricos como la depresión, la esquizofrenia, los desórdenes de ansiedad, entre otros. Dada la prevalencia de estas enfermedades, no es sorprendente que haya una enorme carga emocional asociada a una disminución en la productividad de los individuos, afectando a sus familias y a la sociedad como un todo. El impacto económico de estas enfermedades mentales es muy alto, debido al ausentismo laboral y a los costos de la terapia. El tratamiento de los desórdenes mentales es relevante, ya que es claro que el funcionamiento mental está interconectado con el funcionamiento físico, laboral y social ([World Health Organization, 2003](#)).

### 2.2 Depresión

La depresión es un trastorno afectivo que produce en las personas estados de ánimo caracterizados habitualmente por abatimiento con tristeza o decaimiento. Se acompaña de algunos síntomas específicos como irritabilidad, ansiedad, pérdida o ganancia de apetito o peso, sentimientos de culpa, minusvalía y desesperanza. Este trastorno, provoca, generalmente que las personas afectadas sean incapaces de llevar a cabo sus actividades cotidianas. Asimismo, éstas pueden desarrollar deseos de muerte e ideas suicidas que ponen en peligro sus vidas ([Moreno et al., 2005](#)). Un trastorno depresivo no es lo mismo que un estado pasajero de tristeza. No indica debilidad personal y tampoco es una condición de la cual uno puede liberarse a voluntad; de no estar bajo tratamiento farmacológico, los síntomas pueden durar semanas, meses e incluso años. Sin embargo, la mayoría de las personas que padecen de depresión pueden mejorar con ayuda de tratamiento médico ([National Institut of Mental Health, 2004](#)). La depresión afecta a nivel mundial a 121

millones de personas de las cuales menos del 25% tiene acceso a un tratamiento adecuado ([World Health Organization, 2001](#)). Un estudio realizado a nivel nacional indica que 26.8% de las personas encuestadas (18-65 años) padece o ha padecido alguno de los 23 trastornos mentales, en quinto lugar aparece la depresión mayor con 3.3% ([Medina-Mora et al., 2003](#)).

### 2.2.1 Clasificación de la depresión

Según el manual de diagnóstico y estadística de trastornos mentales (DSM-IV), la depresión se puede clasificar en tres diferentes categorías ([American Psychiatric Association, 2000](#)): Trastorno distímico, trastorno bipolar, trastorno depresivo mayor.

#### 2.2.1.1 Trastorno distímico

Las personas generalmente experimentan poco o ningún disfrute en sus vidas, se preocupan frecuentemente, tienden a volverse inactivos, retraídos, tienen sentimientos de culpa, están irritables, perezosos y con dificultad para dormir de manera regular. La gente con distimia puede cursar con un estado de ánimo crónicamente deprimido hasta el punto en que parecería ser parte de su personalidad.

#### 2.2.1.2 Trastorno bipolar

Llamado también enfermedad maníaco-depresiva, no es tan frecuente, se caracteriza por cambios cíclicos en el estado de ánimo: fases de ánimo elevado o eufórico (manía) y fases de ánimo bajo (depresión). Los cambios de estado de ánimo pueden ser dramáticos y rápidos, pero más a menudo son graduales.

#### 2.2.1.3 Trastorno depresivo mayor

Conocido como depresión mayor, depresión clínica o depresión unipolar (un solo extremo del estado de ánimo), los síntomas varían de persona a persona. Sin embargo está establecido que los pacientes que cursan con este tipo de depresión durante un periodo continuo de dos semanas, 5 de los siguientes síntomas: estado de ánimo depresivo, pérdida de interés o placer, alteración significativa del peso o apetito, insomnio o hiposomnio, agitación o retardo

psicomotor, fatiga o pérdida de la energía, sentimientos de inutilidad, disminución de la habilidad para pensar o concentrarse o estar indeciso, ideas suicidas.

### 2.2.2 Fisiopatología de la depresión

No existe una sola causa para la aparición de la depresión. Los desencadenantes generalmente incluyen una combinación de factores genéticos, psicológicos y ambientales. Por ejemplo, algunos tipos de depresión tienden a afectar a miembros de la misma familia, lo que sugiere que puede existir una predisposición biológica. De hecho, distintos estudios llegan a la conclusión de que es dos veces más probable que los niños con un pariente de primer grado que sufre de un trastorno afectivo, desarrollen la enfermedad y si tienen dos parientes con este tipo de trastornos, el riesgo aumenta cuatro veces ([García-Delgado y Gastelurrutia, 2003](#)). Asimismo, se ha demostrado que algunas enfermedades físicas como los accidentes cerebrovasculares, infartos miocárdicos, el cáncer, el parkinson y los trastornos hormonales, pueden llevar a la depresión. Además, la baja autoestima, la pérdida de un ser querido, los problemas económicos o cualquier otra situación estresante pueden ser los causantes de la aparición de un episodio depresivo. De no existir una explicación patológica convincente y aceptada para el estado depresivo en los humanos, se puede suponer que la depresión podría representar la ruta final común de diferentes desordenes de la función cerebral ([Matthews et al., 2005](#)).

Algunos estudios del cerebro, entre otros los de imagen, han revelado anormalidades neurobiológicas en ciertas estructuras cerebrales asociadas con la depresión mayor. Estas son: la corteza prefrontal ventromedial, corteza prefrontal lateral orbital, corteza prefrontal dorsolateral, corteza cingulada anterior, estriado ventral (incluyendo el núcleo accumbens), la amígdala y el hipotálamo ([Maletic et al., 2007](#)).

Existen tres neurotransmisores conocidos químicamente como monoaminas, los cuales llevan a cabo una función en la regulación del estado de ánimo, éstas son norepinefrina (NE), serotonina (SER) y dopamina (DA).

*Norepinefrina.* Es una catecolamina que se encuentra en varios tejidos, entre ellos el cerebro. Schildkraut en 1965 propuso la hipótesis clásica “de las catecolaminas” de los desordenes del estado de ánimo, para la cual, una mala regulación en la neurotransmisión de la norepinefrina es el factor causal para la depresión. Esta hipótesis establece que la depresión se origina por una deficiencia de norepinefrina en ciertos circuitos cerebrales y que la manía se origina por la presencia de niveles mayores a los normales de este neurotransmisor. A pesar de que existe mucha evidencia que avala esta hipótesis, los cambios en los niveles de norepinefrina no afectan el estado de ánimo en todas las personas. La implicación es que medicamentos tales como la reboxetina, el cual tiene su blanco específicamente en la norepinefrina, es efectivo solo para algunas personas y no lo es para otras (Bondy, 2002).

*Serotonina.* La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una monoamina involucrada en el estado de ánimo y la regulación del apetito. Este neurotransmisor constituye otro factor involucrado en la depresión e interactúa con la norepinefrina para causar la depresión. En la década de los '70 se postuló la “hipótesis permisiva” en donde se propone que una reducción en la cantidad de serotonina en ciertas sinápsis provoca o “permite” una caída en los niveles de norepinefrina (Bondy, 2002).

*Dopamina.* Está asociada con actividades de recompensa o reforzamiento positivo que los individuos obtienen, lo que causa que éstos continúen llevando a cabo una determinada actividad. Aún cuando no existe en la literatura una amplia información que involucre a la dopamina en la fisiopatología de la depresión, se ha demostrado que algunos fármacos con mecanismo de acción novedosa, actúan a través de receptores dopaminérgicos, como el aripiprazole, fármaco aprobado para el tratamiento de trastornos de depresión (Pae *et al.*, 2008). Otro ejemplo son los inhibidores triples de la recaptura de 5-HT, norepinefrina y dopamina (SNDRIs), los cuales pueden producir una acción más rápida y eficaz que los antidepresivos tradicionales (Chen *et al.*, 2008). Los trastornos de depresión son además comunes, en las enfermedades de Parkinson y esquizofrenia, las cuales son patologías asociadas a cambios en la transmisión dopaminérgica (Dailly *et al.*, 2004; Torres, 2006).

Además, existen alteraciones en otros sistemas de señalización química que contribuyen a desarrollar la depresión, tales como incremento de las concentraciones de la hormona liberadora de corticotropina (HLC), incremento de la actividad de acetilcolina (ACh), disminución de los niveles de ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA), exceso en la actividad de los glucocorticoides en depresión mayor, pérdida de volumen del hipocampo.

**GABA.** El ácido  $\gamma$ -amino butírico es el principal neurotransmisor inhibitor en el cerebro. Hay dos tipos de receptores para este neurotransmisor, GABA<sub>A</sub> el cual está acoplado a un canal de cloruro y GABA<sub>B</sub> acoplado a canales de Ca<sup>+2</sup>. En ratas, los antidepresivos y estabilizadores del estado de ánimo regulan positivamente los receptores GABA<sub>B</sub> de la región frontal-cortical. Los agonistas a los receptores GABA<sub>B</sub> pueden aumentar la respuesta del AMPc a la norepinefrina y regulan negativamente los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en respuesta a los antidepresivos tricíclicos, sugiriendo un papel facilitador para GABA<sub>B</sub>. En algunos estudios se ha reportado que los niveles de GABA están reducidos en el líquido cefalorraquídeo de pacientes deprimidos. Los niveles plasmáticos de GABA se han reportado bajos en pacientes con depresión unipolar ([Schatzberg et al., 2002](#)).

### 2.2.3 Tratamiento de la depresión

Debido a la complejidad en cuanto a la etiología de este trastorno, el tratamiento debe ser individualizado y escogido adecuadamente para el paciente, pues se ha demostrado en estudios clínicos que algunos pacientes necesitan una terapia farmacológica antidepresiva, mientras algunos con depresión menos severa evolucionan mejor con otro tipo de terapia. La elección del medicamento antidepresivo se realiza tomando en cuenta la sintomatología presentada por el paciente, así como la severidad de los síntomas, y tratando de evitar efectos secundarios (sedación, pérdida de peso, disfunción sexual, etc.), presencia de algún otro desorden psiquiátrico o somático, respuesta previa positiva o negativa (tolerancia/efectos adversos) a un antidepresivo específico ([Duval et al., 2006](#)). En la actualidad existen diversas sustancias que son empleadas en la clínica como fármacos antidepresivos de eficacia terapéutica demostrada (Tabla 1).

Tabla 1. Fármacos empleados en el tratamiento de la depresión (Duval *et al.*, 2006).

<b>Medicamentos antidepresivos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Antidepresivos tricíclicos y tetracíclicos (ATC)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Clomipramina (IRS&gt;&gt;IRN); amitriptilina (IRS&gt;IRN)</li> <li>○ Imipramina, doxepina, amoxapina (IRN=IRS)</li> <li>○ Desipramina (IRN&gt;IRS)</li> <li>○ Maprotilina (IRN)</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Citalopram, escitalopram</li> <li>○ Fluoxetina (también IRN, y débil bloqueador del receptor D2)</li> <li>○ Fluvoxamina (también IRN, y agonista de la melanina)</li> <li>○ Paroxetina (también IRN&gt;&gt;IRDA)</li> <li>○ Sertralina (también IRDA &gt;&gt;IRN)</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina y noradrenalina (ISRSN)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Venlafaxina, milnacipran, duloxetina</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Antagonistas del receptor de Noradrenalina <math>\alpha_2</math> y antagonistas del receptor de serotonina 5-HT<sub>2</sub></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Mianserina, mirtazapina</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Antagonistas del receptor de serotonina (5-HT<sub>2</sub>)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Trazodona, nefazodona</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Inhibidor de la recaptura de noradrenalina (IRN)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Reboxetina</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Inhibidores de la recaptura de dopamina (IRDA)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Bupropion (también débil IN), metilfenidato</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Inhibidores de la monoamina oxidasa (IMAO)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Irreversible y no selectivos: iproniazida</li> <li>○ Reversible y selectivo:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>IMAO-A (moclobemida, toloxatona)</li> <li>IMAO-B (selegilina)</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Agonista del receptor melatoninérgico (MT<sub>1/2</sub>) y antagonista del receptor 5-HT<sub>2</sub></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Agomelatina</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Otros</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Tianeptina</li> <li>○ Fitomedicamento: <i>Hypericum perforatum</i> (Hierba de San Juan)</li> <li>○ Derivado del aminoácido S-adenosilmetionina (SAM-e)</li> <li>○ Suplementos dietéticos del triptófano y 5 hidroxitriptófano</li> </ul> </li> </ul>

Sin embargo, existen otras terapias empleadas para el tratamiento de la depresión (Tabla 2). Dentro de estas, se emplea la psicoterapia en donde los terapeutas cognitivo-conductuales ayudan a los pacientes a cambiar los estilos negativos de pensamiento y comportamiento que se asocian con la depresión y



se reporta cierta mejoría para cierto tipo de depresión ([National Institute of Mental Health, 2004](#)).

Tabla 2. Terapias contra la depresión ([Duval et al., 2006](#)).

Estabilizadores de Estado de ánimo	Terapias “no químicas”	Psicoterapia
Sales de litio	Deprivación del sueño (Total: toda la noche; parcial: segunda mitad de la noche)	Terapia cognitiva
Antiepilépticos	Terapia de luz	Psicoterapia interpersonal
Carbazepina/oxcarbazepina, valproato sódico/divalproato/valpromida, lamotrigina	Terapia electroconvulsiva	Terapia de solución de problemas
	Estimulación magnética	Psicoterapia psicodinámica interpersonal
	Estimulación del nervio vago	Psicoterapia orientada al psicoanálisis

Sin embargo, las terapias farmacológicas son las que tienen una mayor aceptación por los médicos como elección en el tratamiento de los trastornos depresivos y a pesar de que se han empleado por varias décadas, está bien documentado que el uso de muchos de estos fármacos trae consigo efectos secundarios adversos tales como desecamiento de la boca, sedación, apatía, fatiga, desordenes del sueño, pérdida de la memoria y de la atención, cambios en la velocidad psicomotora, visión borrosa, mareos, agitación, náuseas, dolor de cabeza, estreñimiento, dificultad al orinar ([National Institute of Mental Health, 2004](#); [Kennedy, 2006](#)). Debido a estos, así como a los elevados costos de los medicamentos, un gran número de personas abandona su tratamiento y recurre al empleo de terapias alternativas, tales como el uso de las plantas medicinales. En México, se han empleado las plantas con propiedades medicinales desde tiempos prehispánicos para poder resolver los problemas de salud de las comunidades y a pesar de la conquista de española y de la imposición de una nueva cultura, en la actualidad ésta práctica sigue vigente. Durante la década pasada, la búsqueda de nuevas terapias farmacológicas a partir de plantas medicinales, para tratar de aliviar trastornos del sistema

nervioso central (SNC), ha ido creciendo de manera progresiva en todo el mundo (Zhang, 2004). En la literatura científica se encuentra un gran número de reportes de plantas, pertenecientes a diferentes familias, que muestran tener algún efecto a nivel de sistema nervioso central, se han reportado efectos psicoanalépticos, psicolépticos, psicodislépticos (Carlini, 2003). La mayoría de estos estudios científicos se basan en reportes obtenidos por la medicina tradicional de varias culturas, en donde desde hace miles de años se emplean plantas como recurso disponible para aliviar diversos padecimientos. En la actualidad se emplea un fitomedicamento elaborado con *Hypericum perforatum* (Hierba de San Juan) para el tratamiento de la depresión mediana a moderada (Kasper, 2005). Además, hay un número creciente de publicaciones (Tabla 3) que muestran que a nivel mundial hay muchas plantas a las cuales se detectó actividad antidepresiva.

Tabla 3. Plantas con actividad antidepresiva

Familia	Nombre científico	Referencia
Apiaceae	<i>Centella asiatica</i>	Chen <i>et al</i> ; 2005
Boraginaceae	<i>Echium amoenum</i>	Sayyah <i>et al</i> ; 2006
Fabaceae	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Dhingra y Sharma, 2006
Ginkgoaceae	<i>Ginkgo biloba</i>	Kalkunte <i>et al</i> ; 2006
Lamiaceae	<i>Salvia elegans</i>	Herrera-Ruiz <i>et al</i> ; 2006
Meliaceae	<i>Trichilia catigua</i>	Campos <i>et al</i> ; 2005
Myristicaceae	<i>Myristica fragrans</i>	Dhingra y Sharma, 2006
Piperaceae	<i>Piper longum</i>	Lee <i>et al</i> ; 2005
Polygalaceae	<i>Polygala tenuifolia</i>	Cheng <i>et al</i> ; 2006
Tiliaceae	<i>Tilia mexicana</i>	Pacheco-Benítez, 2008

La especie *Tilia mexicana* recientemente ha sido objeto de estudios fitoquímicos y farmacológicos en los cuales se comprueba que tiene un efecto depresor del sistema nervioso central.

### 2.3 La familia Tiliaceae

La familia Tiliaceae se distribuye ampliamente a nivel mundial y las flores de plantas de ésta familia se han empleado en la herbolaria de varios países como sedante, antiespasmódico, diaforético, emoliente, anticatarral, diurético, antirreumático (Volák y Stodola, 1990; Wichtl, 2004). Actualmente se han hecho algunos reportes que indican que algunos miembros de ésta familia poseen compuestos que tienen la capacidad de deprimir la actividad del sistema nervioso. En un estudio realizado en Portugal, se evaluó *Tilia europea* en la prueba de laberinto elevado en forma de cruz con ratones a diferentes dosis (10 a 100 mg/kg), demostrándose un aumento significativo en el tiempo de inmovilidad y una disminución en los estiramientos verticales, lo que sugiere un efecto sedante (Coleta et al., 2001). Además, la administración intraperitoneal de una fracción, cuyos constituyentes no han sido identificados, proveniente de *Tilia tomentosa* provoca efectos ansiolíticos en ratones en el modelo de laberinto elevado en forma de cruz (Viola et al., 1994).

#### 2.3.1 Aspectos químicos

Se ha realizado diversos estudios fitoquímicos de extractos polares de plantas del género *Tilia* distribuidas a nivel mundial. En la Tabla 4 se agrupan algunos reportes de los compuestos químicos que han podido ser aislados e identificados, estos compuestos químicos están vinculados con el efecto biológico en el tratamiento de diferentes enfermedades a nivel mundial.

Tabla 4. Compuestos aislados de plantas del género *Tilia*

<b>Grupo de compuestos químicos</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Especie vegetal</b>	<b>Referencia</b>
<b>Flavonoides</b>	Canferol 3,7-O--L-diramnósido y quercetina 3,7-O--L-diramnósido, tilirósido	<i>T. argentea</i>	Zub, 1972, Toker <i>et al.</i> , 2004
	Canferol	<i>T. tomentosa</i>	Viola, 1994
	Pelergonidina, cianidina, cloruro de delfinidina	<i>T. platyphyllos</i> , <i>T. cordata</i>	Oswiecimska y Bednarska, 1976; Oswiecimska <i>et al.</i> , 1976
	Rutina, hiperósido, quercitrina, isoquercitrina, ramnósido de quercetina, quercetina 3-gluco-7-ramnósido, astragalina, Canferol 6''-p-ester coumarico tilirósido, Canferol 3-gluco-7-ramnósido, Canferol 3,7-diramnósido	<i>T. cordata</i>	Wichtl, 2004
	3-O-glucósido de quercetina y 1,3-O-diglucósido de quercetina	<i>T. americana</i>	Hockok y Anway, 1972
	Tilirósido, Rutina, Quercitrina, Canferol y Quercetina	<i>T. americana</i> L. <i>var. mexicana</i>	Herrera-Ruiz <i>et al.</i> , 2008
<b>Terpenos</b>	$\beta$ -sitosterol	<i>T. americana</i> L. <i>var. mexicana</i>	Aguirre-Hernández <i>et al.</i> , 2007
	linalool, geraniol, 1,8-cineole, carvona, canfor, timol, carvacrol, anetol, eugenol, benzil alcohol, 2-fenil etanol, $\beta$ -cariofileno	<i>T. cordata</i>	Wichtl, 2004
<b>Ácidos grasos</b>	No identificados	<i>T. americana</i> L. <i>var. mexicana</i>	Aguirre-Hernández <i>et al.</i> , 2007
<b>Azúcares</b>	Fucogalactoxiloglucano, L-fucosa, D-galactosa, D-xilosa y D-glucosa	<i>T. americana</i>	Hockok y Anway, 1972

Estudios fitoquímicos previos permitieron identificar que la especie *T. americana* contiene principalmente sacáridos entre los que destacan, el fucogalactoxiloglucano, L-fucosa, D-galactosa, D-xilosa y D-glucosa. Se ha observado que varias poblaciones de esta especie colectadas en Estados Unidos de América presentan cierta diferencia en su contenido metabólico. Las muestras colectadas en el Sur contienen principalmente 3-O-glucósido de quercetina y 1,3-O-diglucosido de quercetina. Estos flavonoides glucosilados no fueron detectados en las poblaciones colectadas en el norte (Hockok y Anway, 1972). Diversos estudios realizados con la especie mexicana *T. americana* var. *mexicana* determinaron que contiene ácidos grasos y el terpeno  $\beta$ -sitosterol (Pérez-Ortega et al., 2008). Los flavonoides tilirósido, rutina, quercitrina, canferol y quercetina se aislaron de brácteas de esta especie (Herrera-Ruiz et al., 2008). De *T. argentea* se logró el aislamiento de una serie de flavonoides y sus correspondientes glicósidos (Zub, 1972; Toker et al., 2004). Algunas especies de este género presentan leucocianidinas y proantocianidinas en diferentes órganos. Las antocianidinas identificadas fueron: pelargonidina, cianidina y cloruro de delphinidina. Las concentraciones de este último compuesto en *T. platyphyllos* y *T. cordata*, excede el 0.70%. (Oswiecimska y Bednarska, 1976; Oswiecimska et al., 1976).

### 2.3.2 *Tilia americana* var. *mexicana*

El nombre botánico de esta especie es *Tilia americana* var. *mexicana* (Schltdl.) J. W. Hardin [sinónimo: *Tilia mexicana* (Schltdl.)]. A continuación se presenta la clasificación taxonómica de esta especie (Brands, 2008).

Dominio: ***Eukaryota***  
Reino: ***Plantae***  
Subreino: ***Viridiaeplantae***  
Phylum: ***Tracheophyta***  
Subphylum: ***Euphyllophytina***  
Infraphylum: ***Radiatopses***  
Clase: ***Magnoliopsida***  
Subclase: ***Dilleniidae***  
Superorden: ***Malvanae***  
Orden: ***Malvales***  
Familia: ***Tiliaceae***  
Subfamilia: ***Tilioideae***  
Tribu: ***Tilieae***  
Género: ***Tilia***  
Especie: ***Tilia americana***  
Variedad: ***mexicana***

Esta especie tiene varios nombres comunes de acuerdo a la región donde se encuentre la planta, Cirimo, Tila, Tilia, Tirimo, Tzirimo y Tzirimu (Michoacán y Jalisco), Yaca y Yaco (Oaxaca), Tilia (Morelos, Hidalgo) (Martínez, 1979). Es un árbol de tallo recto con corteza lisa (Figura 1 a), de 18-35 m altura y 1 m de diámetro, que presenta follaje vistoso, tiene hojas simples en posición alterna, dentadas o lobadas, de color verde claro a verde oscuro, glabras en el haz, más pálidas y menudamente vellosas en el envés de la hoja, donde resalta mucho la nervadura que es palmeada, con nervios secundarios o laterales. Las hojas son de 8 a 14 cm de largo, en forma de corazón, con los lados desiguales en la base y el ápice puntiagudo, de bordes irregularmente dentados (Figura 1 b, c). Las flores son fragantes, aparecen en cimas y nacen de una bráctea angosta (Figura 1d), cuando son jóvenes los pétalos son blancos con un tono rosado en la parte ventral- dorsal y se tornan amarillentos con la madurez (Figura 1b); presenta un fruto globoso de unos 7 mm, con una o dos semillas viables (Figura 1e). La época de floración se da entre los meses de Abril-Junio (Martínez, 1987; Argueta, 1994; Martínez y Matuda, 1979; Pavón, 2000). Esta planta es originaria de México; se le encuentra en diversos tipos de suelo entre ellos los andosoles y litosoles, crece en bosques mesófilo de montaña, bosque de pino, bosque de encino, entre los 1300 y los 2400 msnm. En la Figura 2 se muestra un mapa de la distribución espacial de esta especie en la república mexicana. Se le encuentra desde los estados de Chihuahua y Coahuila en el norte del país hasta los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas. Esta especie

vegetal está asociada a algunas de las principales cadenas montañosas de la república mexicana y restringida a menos del 1% de la superficie total del país (Pavón, 2000).

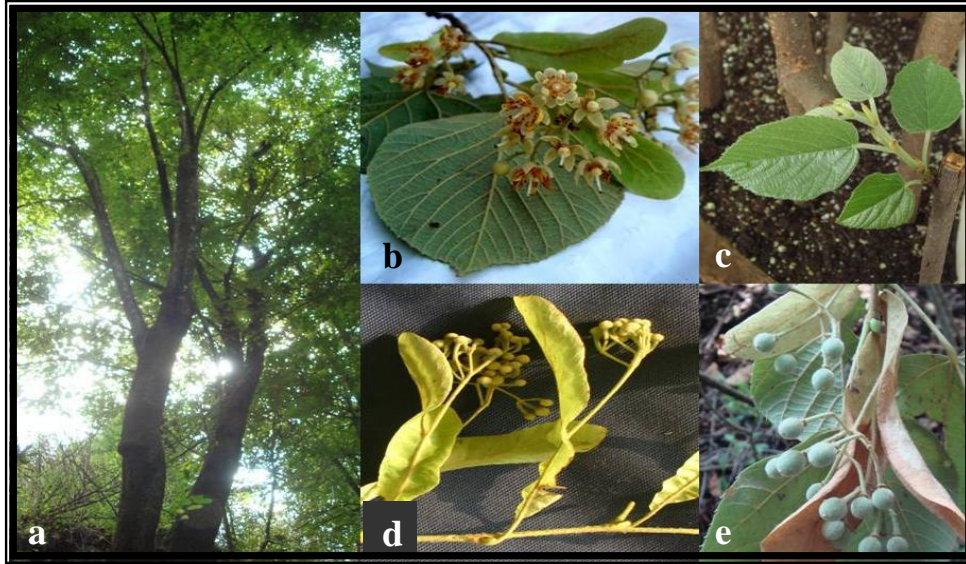


Figura 1. Árbol conocido popularmente como tila. Fotografía de un ejemplar y sus diversas partes a) tallo, b) flores, c) hojas, d) brácteas, e) frutos

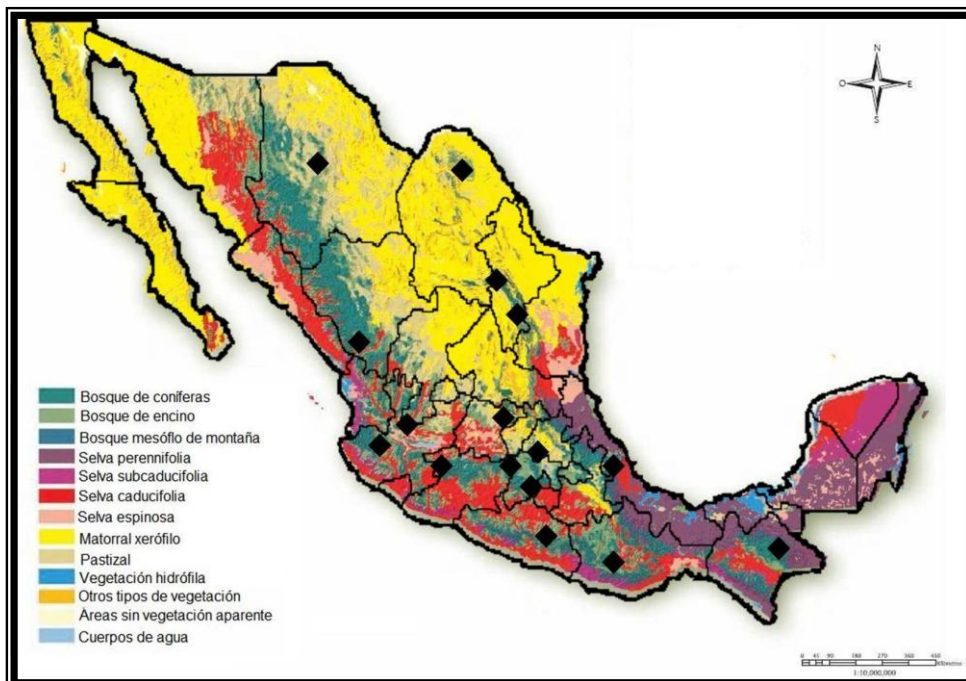


Figura 2. Distribución natural a nivel nacional de *Tilia americana* var. *mexicana* (Pavón, 2000)

### 2.3.2.1 Usos de tila en México y su situación ecológica

Se han reportado varios usos que se le da en la medicina tradicional a la tila, por un lado, se usa la parte aérea, principalmente para el tratamiento de trastornos nerviosos; la planta fresca es más activa para conciliar el sueño, en general es útil para calmar los estados de excitación nerviosa acompañada de insomnio, dolor de cabeza y malestar en general (Martínez, 1969; Martínez y Matuda; 1979, Bello, 1993). Otros usos de la infusión de flores de esta planta reportados son como: antiespasmódica y contra la tos (Martínez, 1969), para tratar la enterocolitis, gastroenteritis, hemorroides, cólicos hepáticos y nefríticos, dolores de la vejiga inflamada y el corazón (Pavón, 2000). El té se bebe si se hacen corajes o se riega la bilis, así como cuando se tiene una enfermedad del hígado, y después de la comida para mejorar la digestión (Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2007).

Además de los usos medicinales la planta ha sufrido sobreexplotación debido a que su madera es muy suave y se elaboran con ella diversas artesanías como guitarras, utensilios de cocina y herramientas. Aunado a esto, el hábitat de la tila se ha reducido de manera alarmante debido al cambio de uso del suelo y el crecimiento desmedido de las zonas urbanas. Los árboles muchas veces son derribados completamente para obtener las flores y las brácteas que se comercializan para la elaboración de infusiones con actividad antidepresiva, frustrando el desarrollo de frutos y semillas, limitando así la propagación sexual impidiendo el crecimiento y la regeneración de poblaciones naturales. Por otro lado, esta especie tiene problemas para su propagación por vía sexual ya que sus semillas cuentan con dos tipos de latencia, una latencia exógena donde la testa es impermeable al agua e impide el intercambio gaseoso con el medio exterior, y una latencia endógena donde el embrión es inmaduro (Santiago, 1998). Por todo lo anterior esta especie es catalogada por la NOM-ECOL-059-2001 como una especie en peligro de extinción.

### 2.3.2.2 Aspectos farmacológicos

Se han realizado algunos estudios farmacológicos con extractos y fracciones de diferente polaridad de las brácteas de *T. americana* var. *mexicana*, los cuales reportan actividad depresora del sistema nervioso central. En la Tabla



5 se cita el tipo de actividad farmacológica encontrada, el modelo biológico empleado y el compuesto químico responsable de la acción biológica.

Tabla 5. Actividad farmacológica de diferentes extractos y sus fracciones de *T. americana* var. *mexicana*

Actividad farmacológica	Modelo biológico	Extracto o fracción	Compuestos químicos	Efecto tóxico	Referencia
Ansiolítica	LEC	Hex MeOH	---	+	(Aguirre Hernández <i>et al.</i> , 2007a)
Ansiolítica, Sedante	LEC	Hex	β-sitosterol (Terpeno)	-	(Aguirre Hernández <i>et al.</i> , 2007b).
Ansiolítica, Sedante	LEC, Potenciación a barbitúricos	Aqu	Derivados de quercetina y canferol	-	(Pérez-Ortega <i>et al.</i> , 2008)
Ansiolítica	LEC	MeOH, F1, F1C,	tilirósido, rutina, quercitrina, canferol y quercetina (flavonoides)	-	(Herrera-Ruiz <i>et al.</i> , 2008)
<b>Antidepresiva</b>	NF, SC	HA, Ta1Fa, Ta2A, Ta2M, Ta2AM 60-40	Triterpenos	+	(Pacheco-Benítez, 2008)
<b>Antidepresiva</b>	NF	HA, FA, 2F	No flavonoides	-	(Maldonado-Abarca, 2008)

+ Registrado, - No registrado. **LEC**: Laberinto elevado en forma de cruz, **NF**: Natación forzada, **SC**: Suspensión por la cola. **Hex**: Hexánico, **MeOH**: Metanólico, **Aqu**: Acuoso

#### 2.4 Modelos animales de desordenes psiquiátricos

Geyer y Markou, (2002) definen “modelo preclínico” como una preparación experimental desarrollada con el propósito de estudiar una condición específica en la misma o diferentes especies. Sin embargo, es necesario escoger un modelo adecuado y ser cuidadosos al interpretar los resultados obtenidos en la evaluación preclínica, para poder proponer un compuesto químico con actividad antidepresiva. Además, es necesario realizar una evaluación

confirmatoria de que el compuesto presenta la actividad deseada y no resulta ser en realidad un falso positivo para el modelo preclínico empleado. Los modelos animales han sido extensivamente utilizados para investigar los trastornos neuropsiquiátricos y su tratamiento, tal es el caso de la depresión (McArthur y Borsini, 2006).

#### 2.4.1 Modelo de natación forzada (NF)

El modelo de natación forzada es una metodología que utilizó Porsolt en 1977 para determinar las acciones antidepresivas de sustancias (Porsolt *et al.*, 1977). Este modelo es probablemente el más empleado en la búsqueda del potencial antidepresivo de un compuesto nuevo (McArthur y Borsini, 2006) o extracto y fracciones de plantas medicinales (Zhang, 2004). El parámetro más importante de esta prueba, es el tiempo de inmovilidad de los animales cuando se los somete a una prueba de natación (Figura 3). Se ha demostrado que los fármacos antidepresivos tienen la capacidad de disminuir la duración del periodo de inmovilidad. Por lo cual, el modelo de natación forzada es una prueba farmacológica experimentalmente válida en la búsqueda de sustancias de origen vegetal que pudieran tener eficacia antidepresiva en la clínica. Este modelo es sensible a fármacos como los tricíclicos, inhibidores de la enzima monoamino oxidasa (IMAO), inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), cada uno de los cuales muestran respuestas variables.



Figura 3. Ratón expuesto a la prueba de natación forzada

## 2.4.2 Modelos de actividad locomotora

Debido a que existen reportes de que algunos fármacos que potencian la transmisión monoaminérgica pueden producir efectos falso-positivos en la prueba de natación forzada (Borsini y Meli, 1988), es de gran importancia realizar una prueba confirmatoria en un modelo de evaluación de la actividad locomotora (Hemby *et al.*, 1997). Existen algunos modelos para evaluar la actividad locomotora; sin embargo, uno de los más empleados es el modelo de campo-abierto.

### 2.4.2.1 Modelo de campo-abierto (CA)

Este modelo fue desarrollado en el año de 1934 por Calvin Hall y en la actualidad es uno de los más empleados para estudiar parámetros conductuales animales tales como ansiedad, sedación o valoración de la actividad motora (Prut y Belzung, 2003). Originalmente se emplearon ratas para el estudio de la emocionalidad (Hall, 1934); los roedores se colocan durante 5 min en un dispositivo cuadrículado desconocido, el cual previene el escape por la implementación de paredes (Figura 4). Los parámetros evaluados son el número de cruces de líneas de cada cuadrante en el piso (actividad horizontal), frecuencia de estiramientos verticales (actividad vertical) y número de veces que el animal se acicala (Prut y Belzung, 2003).

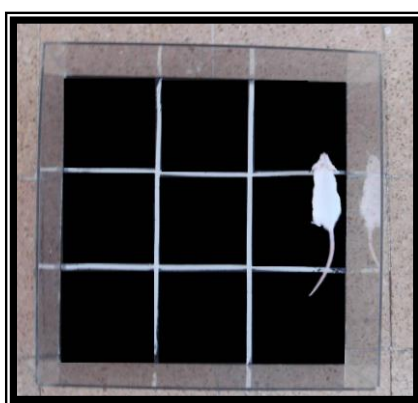


Figura 4. Ratón en la prueba de campo-abierto

## 2.5 Investigación fitoquímica

Durante décadas la medicina tradicional mexicana y la medicina tradicional a nivel mundial ha empleado a las plantas como una alternativa para el

tratamiento de los padecimientos que afectan a los humanos, inclusive durante muchos años esta práctica fue el único modo de cubrir sus necesidades médicas. En este sentido el conocimiento del empleo de las plantas así como el método de extracción de los compuestos activos se transmitió de generación en generación. Los métodos tradicionalmente empleados para la separación de los metabolitos del material vegetal incluían extractos de agua caliente para elaborar tés o tinturas; las decocciones y ungüentos eran elaborados de una sola fuente vegetal, pero también se emplearon mezclas complejas de plantas, buscando un mejor efecto en el tratamiento de algún padecimiento específico.

En la actualidad se ha avanzado bastante en el desarrollo de las técnicas y métodos empleados para la extracción, identificación de compuestos activos, así como de su elucidación estructural. Los métodos modernos de aislamiento de los productos naturales a diferencia de los métodos tradicionales, utilizan principios de separación que se basan en la polaridad (solubilidad relativa en solventes orgánicos), solubilidad en agua y varias alteraciones de las solubilidades basadas en sales y pH (Cseke *et al.*, 2006). La metodología para realizar el aislamiento e identificación de los compuestos activos incluye una orientación biodirigida, lo cual quiere decir que el fraccionamiento de los extractos y la purificación de los compuestos serán dirigidos por los resultados obtenidos en bioensayos o también llamadas pruebas biológicas. En la Figura 5, se muestra un diagrama de flujo donde se esquematizan las fases por las cuales pasa un proyecto multidisciplinario de investigación de plantas medicinales. En el proceso del descubrimiento de nuevos medicamentos, los compuestos activos puros obtenidos por un aislamiento biodirigido de extractos de plantas medicinales, son sometidos a estudios de relación estructura-actividad. Se deben realizar estudios de toxicidad y seguridad, así como también estudios clínicos. Los compuestos activos deben ser preparados a escala industrial, y se tiene que desarrollar una formulación farmacéutica apropiada antes de que el compuesto pueda ser aprobado como un nuevo medicamento. Además en el seguimiento del aislamiento de los compuestos activos, los resultados de las pruebas farmacológicas pueden dirigir al establecimiento de extractos estandarizados. En este caso, la producción industrial de los extractos estandarizados puede comenzar inmediatamente

después de los estudios de toxicidad y seguridad. Después de la formulación de estos extractos estandarizados se pueden llevar a cabo las pruebas clínicas, las cuales pueden llevar a la aprobación del medicamento (Pieters y Vlietinck, 2005).

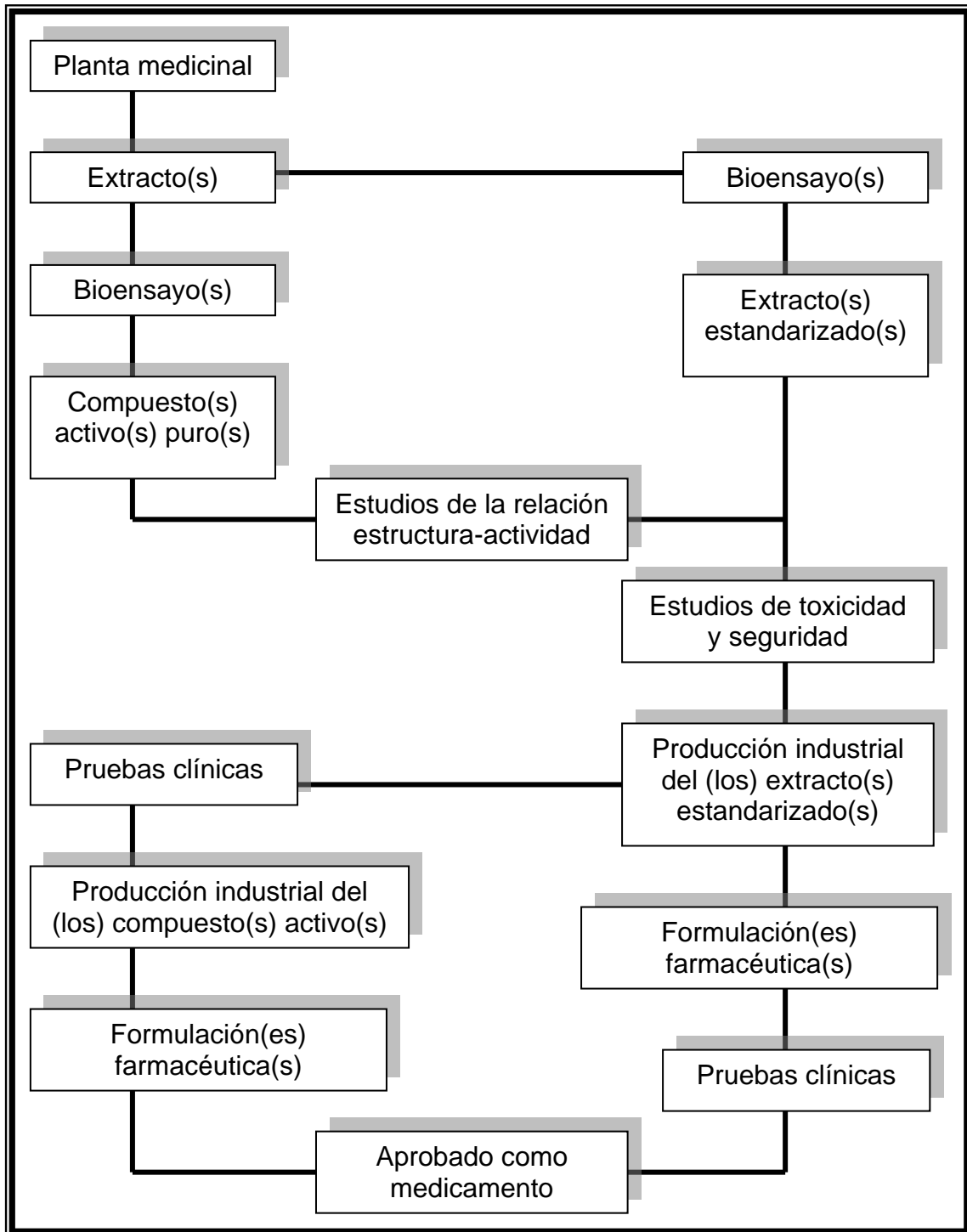


Figura 5. Diagrama general del estudio de plantas medicinales (Pieters y Vlietinck, 2005)

### 2.5.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

La CCF es una técnica fácil, barata y ampliamente utilizada para la identificación de compuestos naturales. Es una técnica de separación de muestras, en donde se aplica una muestra del analito sobre una capa delgada y aplanada que contiene un sorbente (fase estacionaria). Posteriormente, ésta se coloca en un recipiente con un volumen adecuado de disolvente (fase móvil). Por medio de capilaridad el disolvente migra hacia la parte superior, a través del sorbente. La detección de compuestos se logra por la aplicación de químicos reveladores tales como sulfato cérico amoniacal,  $H_2SO_4$  o algunos otros. En caso de emplearse como sorbente silica (fase estacionaria normal), los compuestos polares tienen alta afinidad por esta y se mueven lentamente a través de la placa conforme migra el disolvente (Skoog *et al.*, 2001).

### 2.5.2 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC por sus siglas en inglés, es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada, debido a que tiene una alta sensibilidad, fácil determinación, cuantitativa exacta, idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y su gran aplicabilidad a sustancias que son de interés en la industria.

La separación se efectúa en una columna cromatográfica empacada con un sólido inerte, finamente molido, cubierto con una fase estacionaria. Una fase líquida móvil a gran presión se hace pasar a través de la columna. A medida que la fase móvil arrastra una mezcla por la columna, los componentes de la mezcla interactúan con la fase estacionaria. La interacción se puede basar en la solubilidad, la atracción electrostática (entre cargas eléctricas positivas y negativas), en la adsorción (fuerzas de atracción en la interfase entre dos fases inmiscibles) o en otros mecanismos. En el caso normal, las interacciones implican atracciones debidas a fuerzas intermoleculares. Los distintos compuestos de la mezcla interactúan con la fase estacionaria con diversas intensidades, y por ello unos componentes pasan más tiempo asociados a la fase estacionaria que otros. La interacción retarda el avance de los componentes a través de la columna. Los que tienen interacciones

relativamente débiles con la fase estacionaria son arrastrados por la fase móvil con bastante rapidez por la columna. Los que interaccionan fuertemente con la fase estacionaria quedan mucho más tiempo en la columna. Esto da como resultado la separación de la mezcla en sus componentes, y los componentes salen de la columna en tiempos distintos. El tiempo que tarda determinado componente en pasar por la columna se llama tiempo de retención y es un parámetro importante para el análisis cualitativo de los componentes de una mezcla (Spencer *et al.*, 2000).

#### 2.5.2.1 Identificación de flavonoides con espectroscopía ultra violeta (UV)

Los espectros UV de los flavonoides en metanol presentan bandas características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos. Las flavonas y flavonoles muestran tres bandas características: la banda de mayor longitud de onda se presenta en el rango 300-390 nm asociada con la funcionalidad cinamoilo, la banda que se presenta entre 250-280 nm es debida al anillo aromático A (funcionalidad benzoilo). La posición de la banda de mayor intensidad depende del tipo de flavonoide: las flavonas la muestran en 310-350 nm, los flavonoles en 350-385 nm, y los flavonoles 3-O-sustituídos en 330-360 nm. Las flavanonas muestran dos bandas características: la de mayor intensidad en 275-290 nm (Martínez, 2005).

#### 2.5.3 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Ésta es una de las técnicas espectroscópicas más potentes para poder elucidar la estructura de las especies químicas y para la determinación cuantitativa de las especies absorbentes. Se basa en la medida de absorción de la radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias aproximadamente de 4 a 900 MHz que poseen los núcleos atómicos de la muestra. Es necesario colocar el analito en un intenso campo magnético, con el fin de que aparezcan los estados de energía de los núcleos que hagan posible la absorción. Esta técnica puede utilizarse sólo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos), esta situación se da en los átomos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$ .

La RMN de protón ( $^1\text{H}$  RMN) permite determinar la estructura de un compuesto orgánico mediante la medición de los momentos magnéticos de los protones y sus acoplamientos. La RMN de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$  RMN) orienta sobre el esqueleto carbonado de la molécula, carbonos sustituidos, tipos de radicales, sustituyentes, etc. La  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN son en la actualidad las herramientas fundamentales para la elucidación estructural de compuestos orgánicos (Skoog *et al.*, 2001).



### 3. Planteamiento del problema

Según la OMS la depresión es la primera causa de discapacidad en el mundo y representa un 27% de todos los casos de discapacidad generados por cualquier afección. Los medicamentos empleados actualmente en el tratamiento de la depresión inducen diversos efectos secundarios, lo que ha llevado a nuevos planteamientos dentro de la farmacología experimental para la búsqueda de nuevos compuestos a partir de fuentes naturales, como las plantas medicinales. Dentro de la medicina tradicional mexicana se emplea la infusión de brácteas de tila para el tratamiento de los “trastornos nerviosos” y algunos trabajos científicos han permitido comprobar que las brácteas de *T. americana* var. *mexicana* tienen compuestos químicos con capacidad antidepresiva. Sin embargo, las brácteas presentan algunos problemas, debido a que solamente se encuentran en los pocos meses de reproducción de la planta, además de que, la colecta masiva de estas estructuras vegetales limita la propagación sexual de la especie, probablemente siendo esto una de las causas de que el árbol esté en peligro de extinción y con uso restringido. Por lo que resulta importante establecer una estrategia experimental que permita, evaluar el efecto antidepresivo de las hojas, las cuales están presentes durante todo el año y son de mayor abundancia, además de establecer estrategias de cultivo en la obtención de material vegetal.

#### **4. Hipótesis**

Tanto las hojas de plantas silvestres, como las de las plantas cultivadas en invernadero de *Tilia americana* var. *mexicana* contienen compuestos químicos capaces de provocar un efecto antidepresivo sin modificar la actividad motora espontánea.

#### **5. Objetivo general**

Evaluar farmacológica y químicamente los extractos de hojas de *T. americana* var. *mexicana* silvestre y cultivada en invernadero.

#### **6 Objetivos particulares**

1. Establecer un método para la obtención de material vegetal bajo condiciones de invernadero.
2. Caracterizar químicamente el extracto hidroalcohólico de hojas de *T. americana* var. *mexicana* silvestre y cultivada en invernadero.
3. Comparar el perfil cromatográfico del extracto hidroalcohólico de hojas de *T. americana* var. *mexicana* silvestre y cultivada en invernadero.
4. Evaluar el efecto antidepresivo del extracto hidroalcohólico y sus fracciones de hojas de *T. americana* var. *mexicana* silvestre sobre ratones ICR expuestos al modelo de natación forzada.
5. Evaluar el efecto antidepresivo del extracto hidroalcohólico y sus fracciones de hojas de *T. americana* var. *mexicana* cultivada en condiciones de invernadero sobre ratones ICR expuestos al modelo de natación forzada.

## 7. Materiales y métodos

El presente proyecto se llevó a cabo en 4 etapas:

- 1) Obtención del material vegetal, el cual tuvo dos procedencias: silvestre y cultivado en invernadero.
- 2) Obtención del extracto hidroalcohólico de hojas de *T. americana* var. *mexicana* silvestre (HA-hs), y su fraccionamiento. Así como del extracto de hojas obtenidas a través del cultivo por esquejes (HA-hp).
- 3) Análisis químico de extracto y fracciones, utilizando técnicas de CCF y HPLC.
- 4) Finalmente, se llevó a cabo la evaluación de la actividad antidepresiva y conducta motora espontánea, usando los modelos de NF y campo abierto CA.

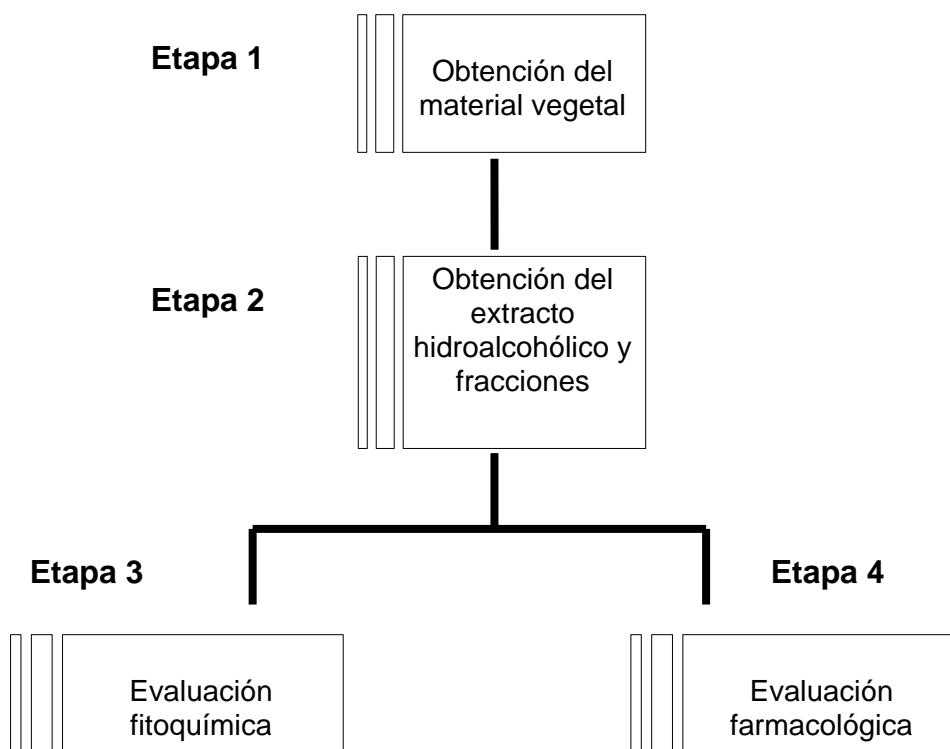


Figura 6. Diferentes etapas realizadas durante el desarrollo experimental

## 7.1 Materiales

### 7.1.1 Material Vegetal

Se colectaron hojas y esquejes de árboles silvestres ubicados en Mexicapa, Estado de México, (18°59'20.22" N, 99°19'11.04" O, 2205 msnm; 18°59'28.05" N, 99°19'26.16" O) a 2327 msnm. La identificación de los especímenes fue realizada en el herbario IMSS, del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por la M en C. Abigail Aguilar Contreras, quién le asignó el número de voucher 15 099 con el nombre científico de *Tilia americana* var. *mexicana* (Schltdl.) Hardin.

#### 7.1.1.1 Colecta de hojas

Durante el mes de octubre de 2007 se seleccionaron árboles que tienen una altura aproximada de 18 a 20 m, de éstos se colectaron hojas de 5-15 cm longitud ápice-pecíolo, provenientes de las ramas ubicadas a 2-5 m de la base del ejemplar.

Por el otro lado, se colectaron hojas provenientes del material cultivado en invernadero. Las hojas que brotaron a partir de las yemas apicales y axiales de los esquejes cultivados bajo condiciones controladas fueron colectadas 2 meses después de que fueron sembradas (Junio de 2008), logrando reunir hojas de un tamaño de 3 a 10 cm longitud ápice-pecíolo.

Todo el material vegetal fue colocado en camas de malla para su secado a temperatura ambiente y condiciones de oscuridad, durante 10 días.

#### 7.1.1.2 Colecta de esquejes

De los árboles seleccionados, se colectaron también esquejes a finales de marzo del 2008, que fueron utilizados para la propagación de la especie. El material fue tomado de ramas ubicadas a una altura de 2-8 m de la base del árbol. Éstas se cortaron de una longitud aproximada de 30 cm, tomando en consideración que cada una de ellas tuviera de 3 a 4 nudos y un diámetro de 1.5 cm. Los esquejes fueron lavados en una solución jabonosa durante 5 minutos y enjuagados con agua corriente.

### 7.1.2 Animales para experimentación

Se utilizaron ratones machos de la cepa ICR con un promedio de peso de 38 g, los grupos experimentales se formaron grupos con 6 animales, que se acondicionaron durante tres semanas antes de la experimentación en cajas de acrílico con cama limpia de aserrín, en un ambiente de laboratorio de condiciones de humedad y temperatura constante (25° C) y fotoperíodo controlado de luz/oscuridad 12/12 h y con libre acceso al agua y alimento. 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).

### 7.1.3 Fármacos de referencia

Las sustancias empleadas durante la experimentación, fueron Imipramina (antidepresivo utilizado ampliamente en la clínica y utilizado como control positivo, IMI a 15 mg/kg, SIGMA), vehículo (solvente utilizado en la preparación de los extractos y utilizado como control negativo, carboximetilcelulosa [CMC] al 1%), el extracto hidroalcohólico de *Tilia americana* var. *mexicana*, así como fracciones químicamente menos complejas provenientes de éste.

## 7.2 Métodos

### 7.2.1 Cultivos de esquejes bajo condiciones de invernadero

#### 7.2.1.1 Esquejes

Para la obtención de material vegetal (hojas), se realizó la propagación de tila mediante la siembra de esquejes según el método propuesto por Santiago, (1998), haciéndose algunas modificaciones. Para la propagación del material vegetal fue necesario la utilización de camas, para lo cual se emplearon cajas de plástico (60 x 50 x 20 cm), a las cuales se les realizaron 12 orificios para el drenaje de agua, éstas fueron colocadas dentro de un invernadero bajo una malla de semisombra, la temperatura fue de 31±2° C y la humedad relativa (HR) de 27±2 %. Los cultivos de esquejes se llevaron a cabo en el invernadero del Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS), Xochitepec, Morelos. A los esquejes se les hicieron cortes nuevos en ambos extremos, uno horizontal en el extremo superior y otro diagonal en el extremo basal. Procurando que cada corte estuviera aproximadamente a 1 cm de las yemas

superior e inferior. Posteriormente fueron sumergidos en agua por su extremo basal en recipientes que contenían el talco enraizador Radix 10000 ® (ácido indolbutírico, 10000 ppm). Se sembraron 30 esquejes por caja. El sustrato empleado fue una mezcla (2:1) de tierra de monte y Growing mix ® (Peatmoss, perlita, vermiculita).

Se llevaron a cabo dos estrategias experimentales:

- a) Tratamiento 1 (T1), los esquejes se mantuvieron a la temperatura y humedad relativa del invernadero ( $T_{\text{invernadero}}=31\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{\text{sustrato}}=28\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{HR}=27\pm 2\%$ ).
- b) Tratamiento 2 (T2), se generó un microclima utilizando una cubierta de plástico transparente sobre cada cama sostenida por 3 arcos de alambre ubicados en las orillas y en centro de la cama con una elevación de 20 cm cada uno (Figura 7). Los parámetros ambientales conseguidos fueron: Temperatura del microclima=  $29\pm 2^{\circ}\text{C}$ , Temperatura del sustrato=  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , Humedad Relativa (HR)=  $87.3\pm 2\%$ . Se aplicó el fungicida Benomil ® cada 15 días para evitar la aparición de hongos fitopatógenos.

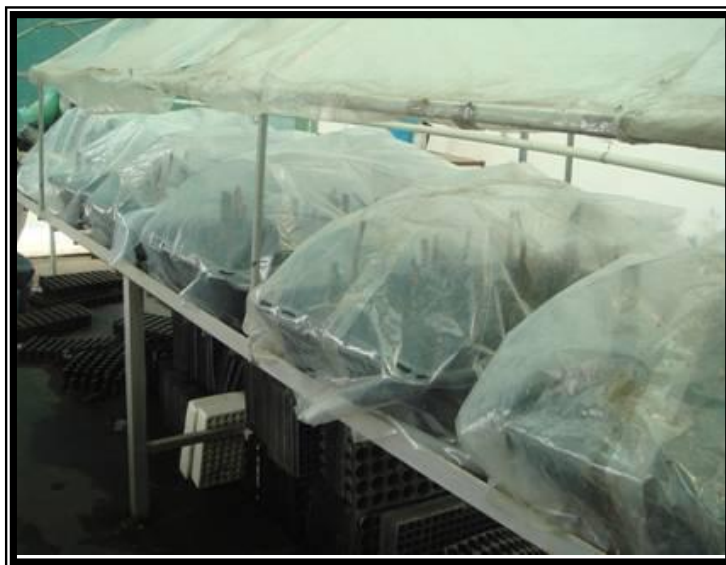


Figura 7. Esquejes de *T. americana* var. *mexicana* acoplados a un microclima. Cultivo con una elevada humedad relativa por la implementación de una cubierta de plástico, durante el tratamiento 2

## 7.2.2 Obtención de extractos y análisis químico

Se llevó a cabo una extracción de las hojas y separación química de compuestos, siguiendo una estrategia dirigida a la obtención de fracciones ricas en flavonoides, debido a que se ha reportado un alto contenido de estos compuestos en las brácteas del genero y especie (Toker *et al.*, 2004), los cuales presentan actividad sobre sistema nervioso central (Herrera-Ruiz *et al.*, 2008). En la Figura 8 se muestra un esquema general de las actividades desarrolladas durante la etapa de análisis fitoquímico del presente proyecto de investigación.

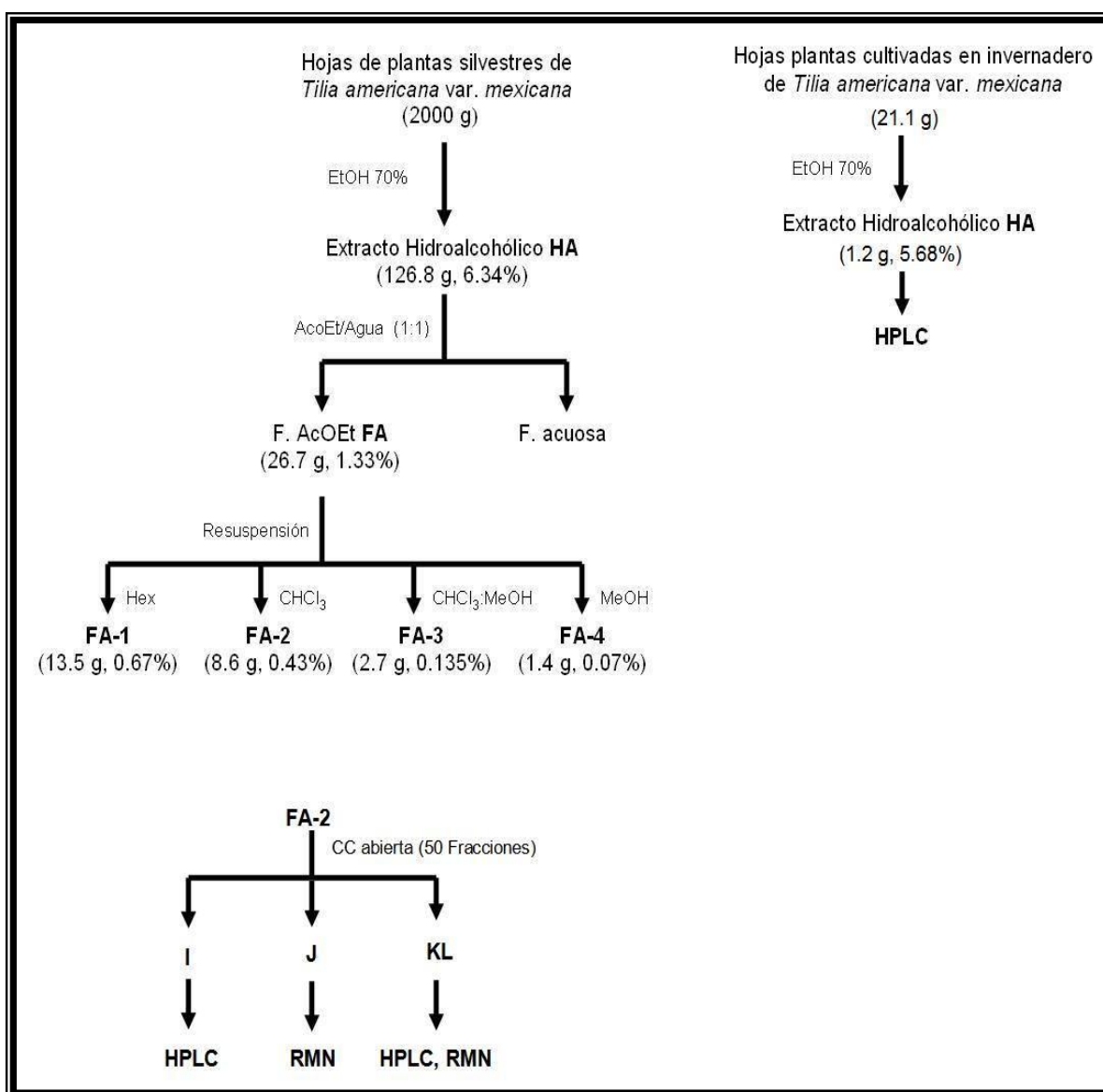


Figura 8. Estrategia experimental del estudio fitoquímico

### 7.2.3 Obtención del extracto hidroalcohólico (**HA-hs**, **HA-hp**)

Para la obtención del extracto hidroalcohólico de hojas provenientes de plantas silvestres (HA-hs), las hojas secas fueron molidas con ayuda de un molino mecánico (Pulvex<sup>®</sup>) hasta obtener un tamaño de partícula aproximado de 4 mm. Posteriormente, 2000 g del material fueron colocados en un recipiente de 25 L para su maceración con 15 L de una mezcla de etanol: agua (70:30) durante 24 h. Después de este periodo se filtro el material vegetal y el líquido fue concentrado por un proceso de destilación a presión reducida en un evaporador rotatorio (Heidolph<sup>®</sup>, Laborota 400). Para eliminar totalmente los residuos de solvente el extracto fue liofilizado (Liofilizadora Heto<sup>®</sup>, Drywinner) y almacenado para el análisis químico y la realización de las pruebas biológicas a 4° C.

Para la obtención del extracto hidroalcohólico de hojas proveniente de material cultivado en invernadero (HA-hp), se pesaron 21.1 g de la hoja seca y se molieron en una licuadora (Osterizer<sup>®</sup>, 450-10) para obtener partículas de un tamaño menor a 2 mm. El material molido fue sometido a un proceso de maceración con etanol al 70% (500 mL) durante 24 h. El disolvente fue eliminado por un proceso de destilación a presión reducida en un evaporador rotatorio, posteriormente el extracto se liofilizó y almacenó para su posterior uso en los ensayos biológicos y comparación química.

### 7.2.4 Fraccionamiento del extracto hidroalcohólico (HA-hs)

Al extracto HA-hs se le realizó una bipartición 1:1 con acetato de etilo (AcOEt) y agua. Se obtuvieron dos fracciones, una fracción acuosa y una fracción orgánica llamada **FA**, que fue almacenada a 4° C hasta su utilización en las pruebas biológicas.

#### 7.2.4.1 Fraccionamiento de FA

Se pesaron 16.7 g de FA que se maceraron en *n*-hexano por 24 h y se filtró, el líquido fue concentrado hasta sequedad en un evaporador rotatorio y denominado **FA-1**. El sólido restante se disolvió en CHCl<sub>3</sub> (cloroformo) y se filtró la mezcla, la fase líquida concentrada fue llamada **FA-2**. El resto del material vegetal se solubilizó con una mezcla de cloroformo-metanol



(CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 9:1), se filtró y se concentró quedando la fracción **FA-3**. El resto de material vegetal fue solubilizado en MeOH y el líquido obtenido y seco fue llamado **FA-4**.

#### 7.2.4.2 Fraccionamiento de FA-2

La fracción de mediana polaridad llamada FA-2, fue sometida a separación por cromatografía por columna abierta. Se pesaron 6.6 g de FA-2 y se adsorbieron en 150 g de sílica gel (1.09385.9025 MERK®; 0.040-0.063 mm), en una columna de 70 cm de altura por 4.5 cm de diámetro. Se utilizó un gradiente de elución con CHCl<sub>3</sub>-MeOH, las primeras fracciones se colectaron en un volumen de 100 ml y las restantes hasta llegar a 50 en 200 mL. Por su similitud química observada en CCF, se lograron reagrupar las fracciones en un número de 15 a las cuales se les dio la nomenclatura de la A a la Ñ (Tabla 6).

Tabla 6. Fraccionamiento de la fracción FA-2 proveniente de HA-hs.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones reagrupadas
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	95:5	1-12	<b>A</b> (1-3) <b>B</b> (4) <b>C</b> (5-6) <b>D</b> (7-10) <b>E</b> (11-12)
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	90:10	13-16	<b>F</b> (14,15 <sub>P</sub> ) <b>G</b> (13, 15 <sub>AM</sub> ,16) <b>H</b> (17-18)
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	85:15	17-30	<b>I</b> (19-21) <b>J</b> (22-25) <b>K</b> (26-28)
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	80:20	31-41	<b>L</b> (31-37)
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	70:30	42-46	<b>M</b> (38-46)
MeOH	100	47-50	<b>N</b> (47-49) <b>Ñ</b> (50)

#### 7.2.5 Cromatografía en capa fina

Se emplearon placas de sílica gel (cromatofolios Merck® de aluminio y sílica gel 60 F<sub>254</sub> 1.05554.0001), usando un sistema de elución de cloroformo:acetonitrilo:metanol (CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>CN:MeOH, 8:1:1; 7:2:1). Para el revelado de los compuestos químicos presentes en las muestras se emplearon los reactivos sulfato cérico amoniacal (CeSO<sub>4</sub>, ácido sulfúrico concentrado 22 mL, hielo 350 g, para la detección de la mayoría de los compuestos), 2-aminoetil difenilborinato (1% en metanol, para la detección de flavonoides) y el

reactivo de Ehrlich (5% dimetilaminobenzaldehído en etanol, para la detección de terpenos). Después de haber aplicado el revelador con ayuda de un hisopo, las placas se colocaron en una parrilla a 150° C durante 5 s.

#### 7.2.6 Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia

Se montó un método cromatográfico en un sistema de separación de módulos Waters 2595 equipado con un detector PDA Waters 996, y el software Empower Chromatographic Manager versión 1 (Waters, USA). El análisis se desarrolló con una columna Altima HP C18-HL Rocket (53 x 7 mm; 3µm). La fase móvil consistió de un sistema de gradiente de H<sub>2</sub>O-TFA 0.5% (solvente A) y CH<sub>3</sub>CN:MeOH, 1:1 (solvente B), el tiempo de elución empleado fue de 24 min con un flujo de 1.0 mL/min; en la Tabla 7 se resume el sistema de elución empleado. Se empleó un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) y la longitud de onda de análisis usada fue 386 nm.

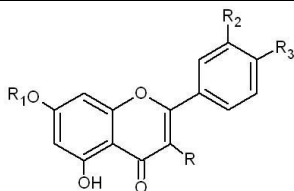
Tabla 7. Sistema de elución empleado en HPLC para analizar las muestras

Minuto	Solvente A (%)	Solvente B (%)
1-3	90	10
3-5	80	20
6-9	60	40
10-14	50	50
15-19	40	60
20-23	10	90
24	90	10

Con este método se analizaron las muestras de HA-hs y HA-hp, para poder hacer una comparación de su contenido químico, también con estas condiciones de trabajo se evaluó el perfil químico de las fracciones obtenidas de HA-hs. Se llevó a cabo un análisis comparativo con los estándares comerciales y el tilirósido (aislado de brácteas de *T. americana*, Herrera-Ruiz *et al.*, 2008), para poder identificar con base a su tiempo de retención ( $t_R$ ) y absorbancia máxima ( $\lambda$ ) en HPLC, si las muestras contenían alguno de estos compuestos (Tabla 8).

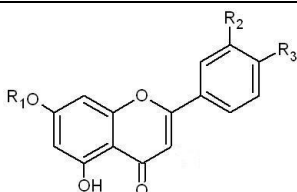
Tabla 8. Estructura química de los estándares de flavonoides comerciales y tilirósido aislado de brácteas de *T. americana* var. *mexicana*

### FLAVONOLES



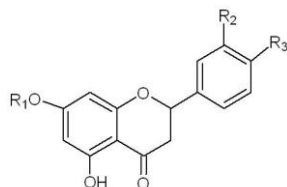
Nombre	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Canferol	OH	H	OH	H
Quercetina	OH	H	OH	OH
Rutina	O-Glc-rha	H	OH	OH
Tilirósido (Til)	Ver estructura	H	-	OH

### FLAVANONAS



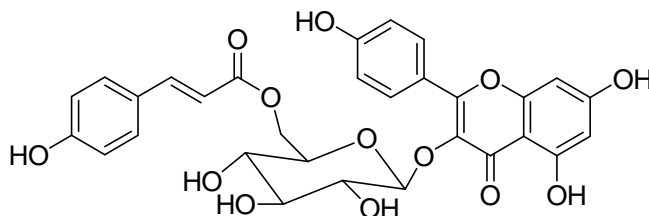
Nombre	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Hesperetina	H	OH	OCH <sub>3</sub>
Hesperidina	Glc-Rha	OH	OCH <sub>3</sub>

### FLAVONAS



Nombre	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Apigenina	H	OH	H
Crisina	H	H	H

**Glc**= Glucosa, **Rha**= Ramnosa



**Tilirósido**

## 7.2.7 Elucidación estructural mediante resonancia magnética nuclear

Los compuestos químicos que fueron aislados, se mandaron al Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIQ-UAEM) para realizar estudios de elucidación estructural. Los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  se obtuvieron a 200 MHz, utilizando cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y como referencia interna tetrametilsilano, usando un espectrómetro de RMN multinuclear (Varian<sup>®</sup>, Inova). El análisis de los espectros se realizó comparando los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  mediante el software ACD/CNMR Predictor v.5.0 de la muestra problema.

## 7.2.8 Métodos de farmacología

## 7.2.8.1 Diseño experimental

Las pruebas biológicas fueron realizadas en un laboratorio sono-amortiguado, a una temperatura de 25° C y con luz roja. Los ratones que recibieron alguno de los tratamientos problema fueron administrados vía oral (vo) 24, 18 y 1 hora antes de las pruebas de natación forzada y campo abierto, en el caso de aquellos que recibieron IMI vía intraperitoneal (ip) recibieron el mismo esquema de tratamiento, pero se sometieron al experimento 30 minutos antes (Tabla 9).

Tabla 9. Tratamientos evaluados en las pruebas farmacológicas

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Prueba farmacológica	Especificaciones	
1 (HA-hs)	200	NF/CA	Extracto hidroalcohólico de hoja de planta silvestre	
2 (FA)		NF	Fracción FA proveniente de HA-h	
3 (FA-2)		NF	Fracción FA-2 proveniente de FA	
4 (B)		NF		
5 (CDE)		NF		
6 (I)		NF/CA	Fracciones reagrupadas, provenientes de la separación por columna abierta de FA-2	
7 (J)		NF		
8 (KL)		NF		
9 (Ñ)		25	NF	
10 (HA-hp)		200	NF/CA	
11 (Til)		NF	Flavonoide estándar	
12 (IMI)	15	NF	Antidepresivo control	
13 (CMC 1 %)	100 $\mu\text{L}$ / 10 g peso	NF/CA	Vehículo (en el que se disolvieron todas las muestras)	

**NF**= Nado forzado, **CA**= Campo abierto

### 7.2.8.2 Pruebas farmacológicas

Las pruebas farmacológicas empleadas en este trabajo de investigación son ampliamente utilizadas en la búsqueda de nuevos compuestos con potencial farmacológico y permiten determinar que los extractos de plantas y sus fracciones presentan actividad antidepresiva, a la vez evaluar si estos tratamientos no provocan cambios en la actividad motora espontánea de los ratones (Zhang, 2004).

#### 7.2.8.2.1 Natación forzada (NF)

Para la realización de esta prueba se utilizaron cilindros de vidrio de 20 cm de alto y un diámetro de 12 cm en una superficie plana, cada uno de ellos se llenó con agua ( $25\pm 1^{\circ}$  C) a una profundidad de 16 cm. Los cilindros fueron separados por un dispositivo de madera que tiene 5 divisiones, lo que permitió registrar el comportamiento de 6 animales a la vez. El experimento consistió de tres fases; la primera denominada “de entrenamiento” consistió en exponer a cada ratón al cilindro lleno con agua durante 15 minutos, una vez transcurrido este tiempo los animales fueron colocados sobre un paño limpio, colocados en una caja con cama de aserrín limpio y expuestos a una lámpara de luz incandescente para su secado. La segunda fase del experimento consistió en administrar el tratamiento correspondiente. En la tercera o fase de prueba, los animales se colocaron nuevamente dentro del cilindro y se evaluó su comportamiento durante 5 min. El parámetro que se midió fue *Tiempo de inmovilidad* (tiempo en el cual los ratones realizan los movimientos mínimos para permanecer a flote y respirar). Al transcurrir el tiempo de la prueba, los animales son colocados en su cama de aserrín para su secado. Durante la primera y segunda fase, los cilindros son lavados con una toalla de papel limpia y humedecida en etanol al 10 % y vueltos a llenar con agua. Cada experimento fue filmado con una cámara de video para el posterior análisis de los resultados.

#### 7.2.8.2.2 Campo abierto (CA)

El dispositivo empleado para esta prueba fue una caja construida con acrílico, la cual tiene paredes transparentes y un fondo negro (30 x 30 x 15 cm). El fondo está dividido en 9 cuadrados de la misma área; el dispositivo está

elevado del suelo 15 cm. La prueba consistió en colocar en el dispositivo al roedor y durante 5 min se registró el número de cruces totales en la superficie del campo (suma del número de cruces al cuadrante del centro y a la periferia) y la frecuencia de estiramientos verticales.

### 7.3 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se realizó un Análisis de Varianza de una vía (one way-ANOVA), posterior a la cual se realizó un análisis post-prueba de Bonferroni con un nivel de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ).

## 8. Resultados

### 8.1 Cultivo en invernadero

Los resultados obtenidos con los dos tratamientos empleados para propagar *T. americana* var. *mexicana* por medio de esquejes se muestran en la Tabla 10. Durante el T1 se presentó una mortalidad del 63.2% a la segunda semana de haberse sembrado, en cambio la muerte de esquejes bajo la condición T2 fue menor. El inicio de aparición de brotes fue similar para T1 (31.2%) y T2 (32%), en la primera semana de cultivo los esquejes ya presentaban hojas. A partir de este periodo, los brotes presentaban coloración rosada, que variaba de tonalidad hasta el café. En la segunda semana la mayoría de los brotes adquirieron un color verde (Figura 9).

Para la octava semana de cultivo en T2 el número de brotes observados fue del 70%. El tamaño de las hojas en esta fase de desarrollo varió en un intervalo de longitud de 3 a 10 cm ápice-pecíolo. En este momento se decidió llevar a cabo la colecta de las hojas que en su totalidad tuvieron un peso seco de 21.1 g, que se utilizó para la preparación del extracto.

Los esquejes cultivados desarrollaron raíces a partir de la segunda semana de cultivo (30%) y hubo esquejes que formaron callo en la base (20%); el porcentaje mayor de enraizamiento se obtuvo en la octava semana de cultivo (60%) y se obtuvo un registro de 30% de esquejes con desarrollo de callo en la parte basal y tan solo el 10% de los esquejes no presentaron raíces ni callos (Tabla 11).

Tabla 10. Resultados obtenidos en la propagación de tila en invernadero

Tratamiento	Esquejes con brotes (%)				Esquejes muertos (%)			
	Semanas de cultivo				Semanas de cultivo			
	1	2	4	8	1	2	4	8
T1	31.2	43.2	NR	NR	54.4	63.2	NR	NR
T2	32	44	64	70	8	16	23	30

NR=No registrado, T1= Tratamiento 1; T2= Tratamiento 2.

Tabla 11. Resultados obtenidos en el enraizamiento de esquejes cultivados condiciones de invernadero

Semanas de cultivo	Esquejes con callo (%)	Esquejes con raíces (%)	Esquejes sin callo/raíces (%)
0	0	0	0
2	20	30	50
4	40	50	10
8	30	60	10



Figura 9. Aparición de brotes bajo condiciones controladas del tratamiento 2. **a)** Primera semana, **b)** Segunda semana, **c)** Tercera semana



Figura 10. Hojas de tila obtenidas en cultivo en invernadero, de tamaño variable.

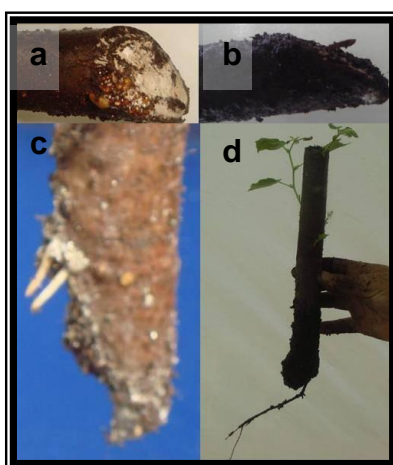


Figura 11. Desarrollo de callo y raíces en los esquejes cultivados en condiciones de invernadero. **a)** Esqueje con callo, **b)** Raíz generada a partir de callo, **c)** Raíces generadas en la base sin previa formación de callo, **d)** Esqueje de 4 semanas, las raíces se desarrollaron sin previa formación de callo.



## 8.2 Obtención de extractos y análisis químico

Los rendimientos obtenidos en la elaboración del extracto HA-hs y HA-hp fueron muy similares (Tabla 12); sin embargo se obtuvieron valores de rendimiento menores que los reportados por Herrera-Ruiz *et al.*, 2008 en la elaboración de un extracto hidroalcohólico de brácteas de tila (14.8%).

Tabla 12. Rendimiento del extracto hidroalcohólico y sus fracciones

Extracto-Fracción	Muestra procesada	Peso obtenido (g)	Rendimiento (%)
HA-hs	2000 g de hoja molida	126.8	6.34
FA		26.7	1.33
FA-1		13.5	0.67
FA-2		8.6	0.43
FA-3		2.7	0.135
FA-4	21.1 g de hoja molida	1.4	0.07
HA-hp		1.2	5.68

### 8.2.1 Análisis por cromatografía en capa fina

La evaluación de las muestras por CCF permitió observar que la fracción FA-1, contiene compuestos poco polares tales como clorofila y algunas ceras, los cuales fueron detectados porque revelaron en tonos café con el reactivo de sulfato cérico amoniacal (Figura 12 a). La fracción FA-2 presenta flavonoides, los cuales fueron revelados como manchas en tonos amarillo, anaranjado y rojo con el reactivo de 2-aminoetil difenilborinato (Figura 12 b). Por otro lado, al revelar las placas con el reactivo de Ehrlich, se observa que las fracciones FA-3 y FA-4 adquieren coloraciones del tono café, indicando la presencia de flavonoides, pero también terpenos (Figura 12 b, c).

La separación de FA-2 dio lugar a fracciones, las cuales fueron analizadas por CCF y reagrupadas por presentar un perfil cromatográfico similares (Figura 13, ver Tabla 6, inciso 7.2.4.2 para referencia del sistema de elución empleado).

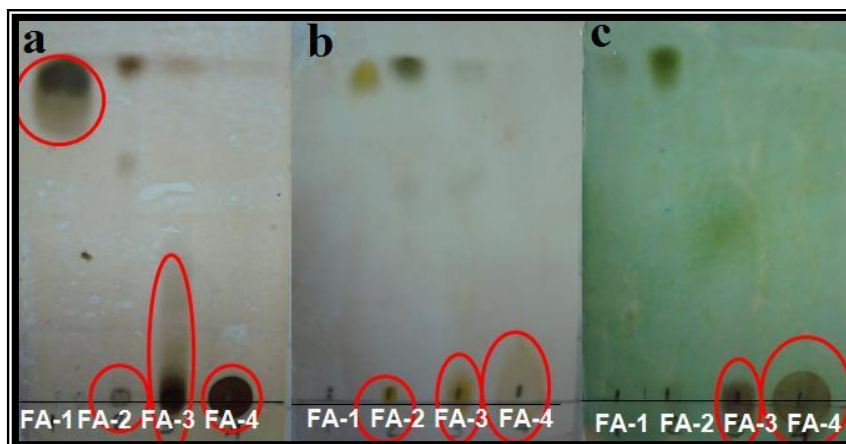


Figura 12. CCF de fracciones del extracto HA-hs. FA-1, FA-2, FA-3, FA-4. Sistema de elución  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$  (8:1:1), y detección: **a)** sulfato cérico amoniacal, **b)** 2-aminoetil difenilborinato y para **c)** sistema de elución  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$  (9:0.5:0.5) y revelado con Ehrlich

En la Figura 13 se observa la similitud entre las fracciones 5 a 12, por lo tanto se decidió agruparlas, las fracciones 5 y 6 se agruparon como fracción C, fracciones 7-10 en fracción D, fracciones 11 y 12 en fracción E. Las fracciones 14, 15 y 16 revelaron compuestos diferentes, por lo que se separaron para su análisis y elucidación estructural. La fracción 15 fue seleccionada, se disolvió en una mezcla de  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  (9:1) y se precipitó un compuesto que se le nombró 15 p, el cual fue analizado por CCF junto con un estándar de glucósido de  $\beta$ -sitosterol, ambos presentaron un perfil cromatográfico similar (Figura 14).

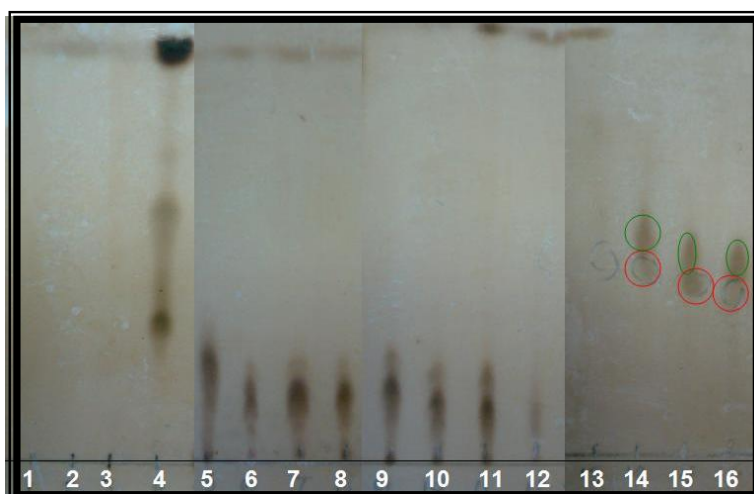


Figura 13. CCF de la fracción FA-2. Sistema de elución, detección: 1-4:  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (95:5), 5-16:  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}$  (90:10); detección con sulfato cérico amoniacal

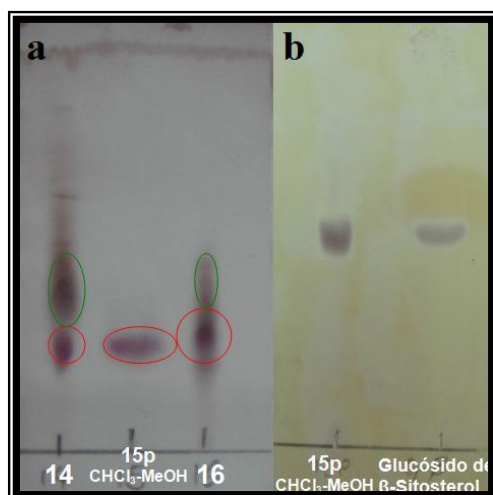


Figura 14. CCF de la fracción 15p proveniente de FA-2. Detección con  $\text{CeSO}_4$ . Sistema de elución a)  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (95:5), b)  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (7:3)

En total se obtuvieron 50 fracciones a partir de FA-2, las cuales fueron agrupadas de acuerdo a su perfil cromatográfico, en 15 fracciones (A-Ñ) (Tabla 6, inciso 7.2.4.2). En la Figura 15 se muestra el perfil cromatográfico de las 15 fracciones, las primeras 5 se eluyeron en un sistema móvil  $\text{CHCl}_3$ :MeOH: $\text{CH}_3\text{CN}$  (8:1:1) y para las restantes diez muestras se empleó el sistema  $\text{CHCl}_3$ :MeOH: $\text{CH}_3\text{CN}$  (7:2:1). La fracción B reveló con ambos reactivos (Figura 14), pero en presencia de 2-aminoetil difenilborinato no aparecen manchas de tono amarillo-naranja lo cual indicaría la presencia de flavonoides; las fracciones C, D, y E presentaron manchas al revelar con el reactivo de  $\text{CeSO}_4$  y no presentaron manchas con el reactivo para flavonoides, de acuerdo a que presentaron un perfil cromatográfico similar se agruparon en una sola fracción (CDE). La fracción F reveló con una mancha color café en presencia del reactivo de  $\text{CeSO}_4$ ; sin embargo, no reveló con 2-aminoetil difenilborinato, lo que sugiere que en esta fracción no están presentes flavonoides. Por otro lado, al analizar la cromatoplatea revelada con el reactivo para flavonoides se observa que la fracción J presenta una mancha definida en un tono amarillo naranja, lo cual fue una sugerencia de que había un compuesto puro aislado, las fracciones K y L fueron muy similares, de tal forma que se decidió reunir las como KL para tener una fracción con una cantidad mayor y poder probarla farmacológicamente (Figura 15 a y b). Además, en ambas fracciones se observó la presencia de flavonoides.

Con la finalidad de identificar los compuestos presentes en la fracción B, ésta fue comparada por CCF con el estándar comercial de ácido ursólico, los resultados indicaron que dicha fracción contiene este terpeno (Figura 16), entre otros productos, dos de los cuales son de baja polaridad (Figura 16 c). Por lo que al resuspender la muestra con *n*-hexano, se logra separar el compuesto más polar, el cual precipita (Figura 16 a).

El análisis por CCF mostró que las fracciones C, D, E presentó perfiles cromatográficos de las manchas similares por lo cual se reagruparon como una sola fracción (fracción CDE), y las fracciones K y L se agruparon como fracción KL, con este nuevo agrupamiento se obtuvieron al final 12 fracciones las cuales se muestran en la Tabla 13; se observó que las fracciones que tuvieron un mayor rendimiento fueron las fracciones B, I y J con 13.94, 8.79 y 6.22% respectivamente.

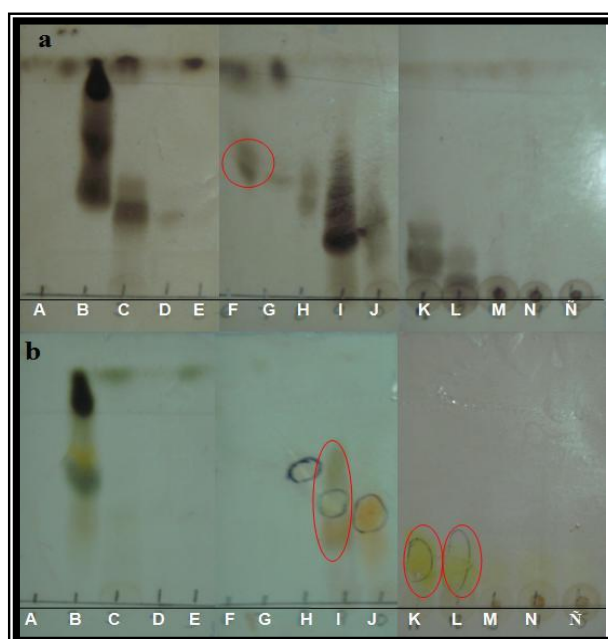


Figura 15. CCF de fracciones obtenidas de FA-2. Sistema de elución  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{CH}_3\text{CN}$  (7:2:1). Detección **a**) con  $\text{CeSO}_4$ , **b**) con 2-aminoetil difenilborinato

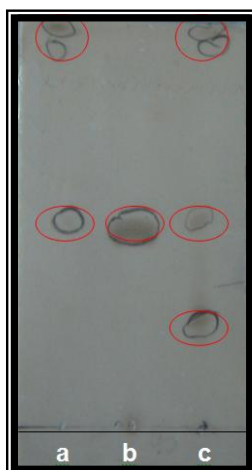


Figura 16. CCF de la reunión B. **a)** Resuspensión de la fracción B con *n*-hexano **b)** Estándar de ácido ursólico **c)** Fracción B. Sistema de elución CHCl<sub>3</sub>:MeOH (95:5), detección con CeSO<sub>4</sub>

Tabla 13. Rendimiento obtenido de las fracciones colectadas por cromatografía en columna a partir de 6.6 g de FA-2

Clave de las fracciones	Cantidad obtenida (mg)	Rendimiento (%)
<b>A</b>	22.9	0.35
<b>B (T4)</b>	920	13.94
<b>CDE (T5)</b>	235.8	3.57
<b>F</b>	68.5	1.04
<b>G</b>	83.5	1.27
<b>H</b>	20	0.30
<b>I (T6)</b>	580.1	8.79
<b>J (T7)</b>	410.4	6.22
<b>KL (T8)</b>	200	3.03
<b>M</b>	244.2	3.70
<b>N</b>	23.7	0.36
<b>Ñ (T9)</b>	51.7	0.78

**T4**=Tratamiento 4, **T5**= Tratamiento 5, **T6**= Tratamiento 6, **T7**= Tratamiento 7, **T8**= Tratamiento 8, **T9**= Tratamiento 9. Estos tratamientos fueron evaluados farmacológicamente

### 8.2.2 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia

Mediante el método de HPLC fueron analizadas las muestras de HA-hs, HA-hp y las fracciones provenientes de HA-hs (FA, FA-2, I, KL). Se utilizaron como estándares diversos flavonoides comerciales y tilirósido obtenido de brácteas de tila por Herrera-Ruiz *et al.*, 2008 (Tabla 14).

Tabla 14. Datos químicos obtenidos por HPLC de flavonoides usados como estándares.

<b>Nombre</b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>λ<sub>máx</sub> (nm)</b>		
<b>Flavonoles</b>				
Canferol	14.35	205.2	266.3	364.6
Quercetina	12.21	207.5	255.7	368.2
Rutina	8.43	211.0	255.7	355.3
Tilirósido	12.06	208.7	266.3	314.8
<b>Flavanonas</b>				
Hesperetina	13.75	205.2	287.6	
Hesperidina	9.10	206.3	248.0	
<b>Flavonas</b>				
Apigenina	13.95	209.9	267.5	337.4
Crisina	19.18	209.9	267.5	314.8

t<sub>R</sub>= Tiempo de retención, λ<sub>máx</sub>= Longitud de onda máxima

Mediante un cromatograma de HPLC se registro el perfil químico de HA-hs, en el que se observan varios picos que sobresalen de los demás y que corresponden a los compuestos mayoritarios, con t<sub>R</sub> en el intervalo de 8 y 9 min. En HA-hs se logró identificar a los flavonoides rutina y tilirósido (Tabla 15). El pico señalado con el número 1 en la Figura 17, corresponde al perfil y valores de t<sub>R</sub> y λ<sub>máx</sub> de la rutina. En este mismo cromatograma se señala al tilirósido (2), cuyos valores corresponden al utilizado como estándar. En la muestra de HA-hs, el tilirósido está representado por un pico muy pequeño, indicando una baja concentración.

Tabla 15. Análisis del extracto HA-hs, por HPLC.

<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>λ<sub>max</sub> (nm)</b>			<b>Identificación</b>
8.05	218.1	256.9	356.5	
8.38	214.5	256.9	356.5	
8.58	206.3	255.7	354.1	<b>Rutina</b>
8.94	212.2	255.7	356.5	
12.02	208.7	266.3	316	<b>Tilirósido</b>

t<sub>R</sub>= Tiempo de retención, λ<sub>máx</sub>= Longitud de onda máxima

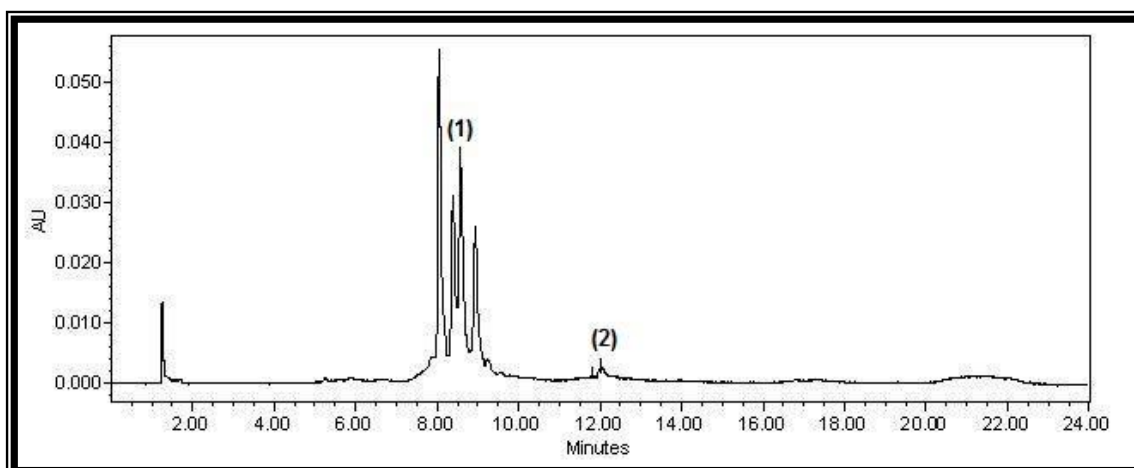


Figura 17. Perfil cromatográfico del extracto HA-hs obtenido por HPLC. Los flavonoides identificados: (1) rutina, (2) tilirósido. Obtenido a una  $\lambda$  de 386 nm.

El análisis de FA también indica la presencia de rutina y tilirósido, además de éstos se observa la presencia de picos que si bien no se pudieron identificar, tienen valores de  $t_R$  y  $\lambda_{max}$  en el intervalo característico de los flavonoides (Tabla 16). En la fracción FA-2 los compuestos rutina y tilirósido también estuvieron presentes (Tabla 17).

Tabla 16. Análisis de FA proveniente de HA-hs, por HPLC.

$t_R$ (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	Identificación
8.02	212.2	356.5
8.54	212.2	354.1
8.89	212.2	356.5
9.52	212.2	348.2
12.00	212.2	313.7

$t_R$ = Tiempo de retención,  $\lambda_{max}$ = Longitud de onda máxima

Tabla 17. Análisis de FA-2 obtenida a partir de FA, por HPLC.

$t_R$ (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	Identificación
8.03	214.5	193.5
8.54	214.5	352.9
8.88	214.5	356.5
9.18	209.9	265.1
9.50	209.9	266.3
11.97	208.7	266.3

$t_R$ = Tiempo de retención,  $\lambda_{max}$ = Longitud de onda máxima

El análisis de las fracciones de FA-2, arrojó que la fracción I contiene varios compuestos los cuales de acuerdo a los valores registrados de  $\lambda_{\text{máx}}$  indican la presencia de favonoles y flavonas, de los cuales sólo pudo identificarse al tilirósido, el cual está contenido en una mayor concentración, lo cual difiere de las muestras previamente evaluadas (Tabla 18); además de flavonoles y flavonas se registraron solo dos valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  o que es característico de sustancias del grupo de las flavanonas. En esta muestra se observaron picos con  $t_{\text{R}}= 17.32$  y  $22.00$  min, los cuales no están presentes en ninguna de las muestras anteriores.

En el perfil cromatográfico de la fracción KL se observan sólo tres compuestos (Tabla 19), dos de los picos observados corresponden a los mayoritarios dentro de los que se identificó a la rutina, el pico menor correspondió al tilirósido.

Tabla 18. Análisis por HPLC de la fracción I proveniente de FA-2.

$t_{\text{R}}$ (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)			Identificación
7.83	198.2	215.7	339.8	
8.28	192.3	289.9		
8.68	201.7	286.4		
8.90	213.4	255.7	356.5	
9.20	198.2	265.1	347.0	
9.51	212	266.3	348.2	
11.95	198.2	266.3	313.7	<b>Tilirósido</b>
17.32	198.2	275.7	327.9	
22.0	239.2	320.8	416.2	

$t_{\text{R}}$ = Tiempo de retención,  $\lambda_{\text{máx}}$ = Longitud de onda máxima

Tabla 19. Análisis por HPLC de la fracción KL proveniente de FA-2.

$t_{\text{R}}$ (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)			Identificación
8.54	216.9	255.7	354.1	<b>Rutina</b>
8.89	214.5	255.7	355.3	
12.0	206.3	266.3	314.8	<b>Tilirósido</b>

$t_{\text{R}}$ = Tiempo de retención,  $\lambda_{\text{máx}}$ = Longitud de onda máxima

En la Figura 18 se muestra el cromatograma de HPLC del extracto HA-hp, se obtuvieron varios picos, pero únicamente se pudo identificar el que se indica con el número 2, el cual corresponde a tilirósido (Tabla 20), éste es uno de los compuestos mayoritarios en el HA-hp; adicionalmente fueron registrados un



pico con  $t_R= 17.29$  min el cual no se encontró en ninguna de las muestras previamente analizadas y un pico con  $t_R= 21.81$  min, éste es uno de los picos más grandes indicando mayor abundancia.

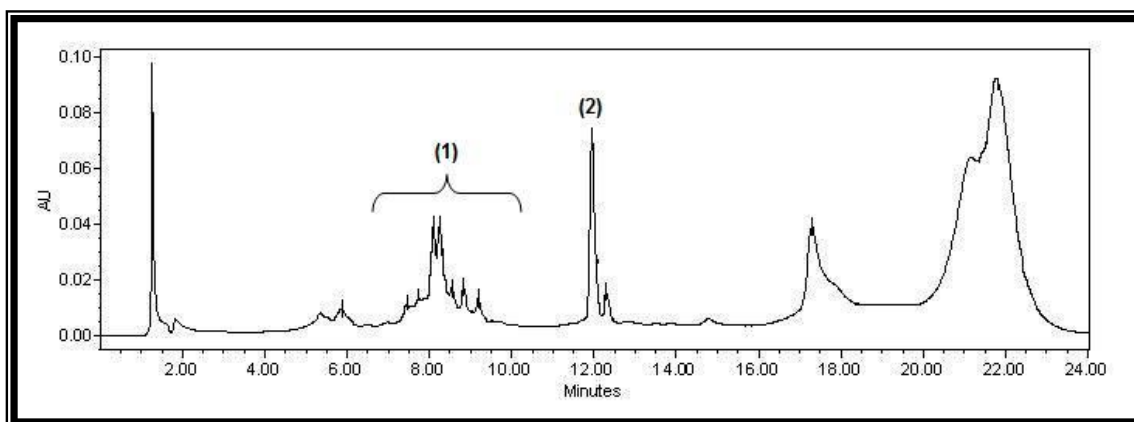


Figura 18. Perfil cromatográfico de HPLC del extracto HA-hp. Los flavonoides (1) grupo de flavonas y flavonoles, identificado: (2) tilirósido. Obtenido a una  $\lambda$  de 386 nm.

Tabla 20. Datos químicos del extracto HA-hp obtenidos por HPLC.

$t_R$ (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	Identificación		
7.45	202.8	249.8	330.3	
8.10	205.2	235.7	316.0	
8.24	211.0	281.7	329.1	
8.55	198.2	255.7	338.6	
8.88	191.1	272.2	360.6	
9.20	201.7	265.1	348.2	
11.94	211.0	266.3	313.7	<b>Tilirósido</b>
17.29	193.5	275.7	327.9	
21.81	202.8	221.6	274.6	

$t_R$ = Tiempo de retención,  $\lambda_{m\acute{a}x}$ = Longitud de onda máxima

La Figura 19 presenta los cromatogramas de ambos extractos: HA-hs y HA-hp. Se puede apreciar las diferencias cromatográficas de éstas muestras. Se observa que el perfil de las muestras se encuentra invertido, así la muestra que proviene de hoja silvestre HA-hs (Figura 19 a) presenta un alto contenido de compuestos del grupo de las flavonas y flavonoles marcados con el número (1), dentro de los cuales está contenida la rutina (2) y en menor abundancia el tilirósido (3). Mientras que en la muestra de hojas propagadas HA-hp se observan picos que no se encuentran en HA-hs y, como compuesto mayoritario

el tilirósido (3, en la Figura 19 b); además, la rutina no esta presente. El grupo de flavonoides (1, en las Figura 19 b) está en menor concentración.

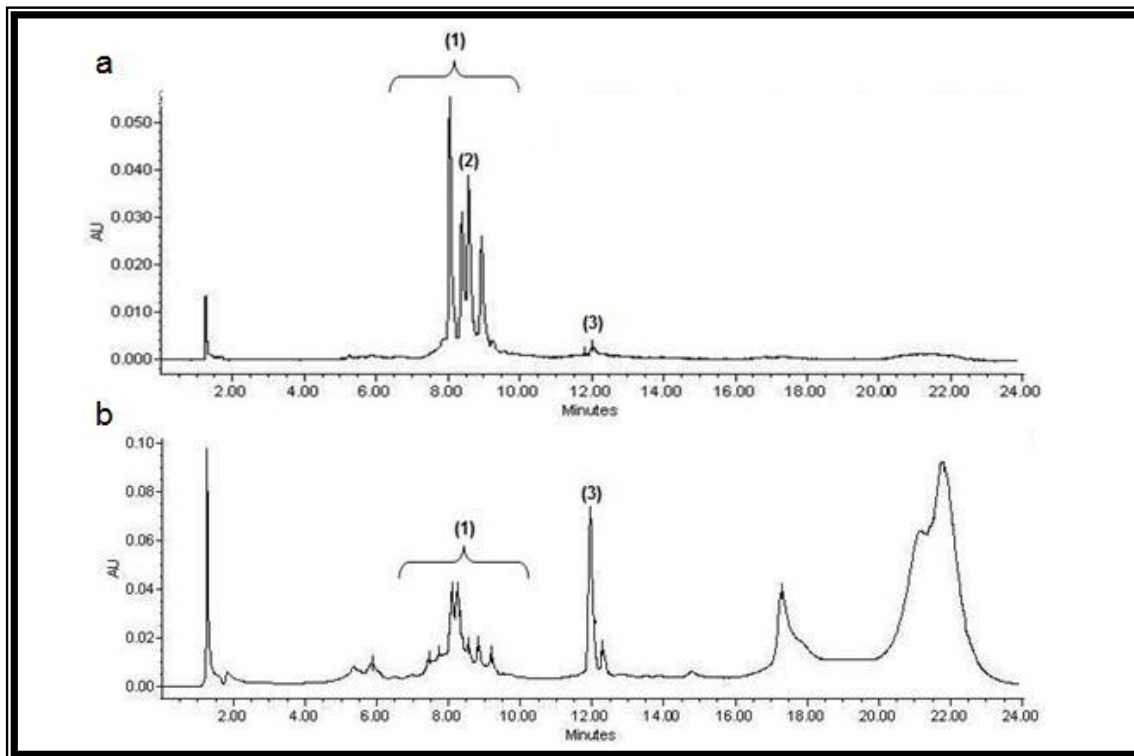


Figura 19. Comparación del perfil cromatográfico obtenido por HPLC entre a) HA-hs y b) HA-hp. (1) grupo de flavonas y flavonoles, (2) rutina y (3) tilirósido. La detección se realizó a una  $\lambda = 386$  nm.

### 8.2.3 Análisis por resonancia magnética nuclear

El fraccionamiento en columna abierta de FA-2 permitió aislar y purificar la fracción J, de la cual a través del método CCF se determinó que el compuesto presente en esta fracción pertenecía al grupo de los flavonoides (ver Figura 15, inciso 8.2.1). Para confirmar esta observación la fracción J fue analizada por RMN y el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (Anexo 1) arrojó valores de desplazamiento químico ( $\delta$  experimental) similares (Tabla 21) a los que se obtuvieron teóricamente ( $\delta$  teórico) del glucósido de quercetina (Anexo 2), por lo tanto se puede determinar que el compuesto presente en la fracción J es glucósido de quercetina.

Tabla. 21. Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de  $^{13}\text{C}$  RMN del glucósido de quercetina

Posición	Desplazamiento químico teórico ( $\delta$ )	Desplazamiento químico experimental ( $\delta$ )	Estructura química	
<b>Aglicona</b>				
1	-	-		
2	156.33	155.22		
3	133.75	132.64		
4	177.55	176.34		
5	161.25	160.13		
6	98.70	97.63		
7	164.10	162.98		
8	93.50	92.41		
9	156.40			
10	104.10	102.99		
1'	121.50	120.27		
2'	115.70	114.14		
3'	144.75	143.46		
4'	148.40	147.28		
5'	115.97	115.11		
6'	121.57			
<b>Azúcar</b>				
1''	101.85	101.08		
2''	72.80	71.19		
3''	75.10	76.56		
4''	69.15	69.86		
5''	76.65	77.23		
6''	61.05	65.68		

La fracción KL se analizó por  $^1\text{H}$  RMN para poder elucidar la estructura química de los compuestos presentes en ésta.; sin embargo, los resultados obtenidos únicamente permitieron determinar que la estructura del compuesto químico presente corresponde a un flavonol glucosilado, lo que concuerda con los datos obtenidos tanto por CCF como por HPLC, en donde  $t_R$  y  $\lambda_{\text{max}}$  corresponden a la presencia de flavonoles glucosilados (Figura 20). Los valores de  $\delta$  presentes en 7.5 ppm son característicos de los protones aromáticos del anillo B (2', 6'), las señales presentes en 6.8 ppm corresponden al protón en 5', la señal con  $\delta$  de 6.4 ppm es característica del protón 8', las señales presentes en 6.2 ppm corresponden al protón 6, los protones presente en el(los) residuo(s) de azúcar presentan valores de  $\delta$  en el intervalo 3.7-4.5 ppm la señal de 1.22 ppm

corresponde al grupo CH<sub>3</sub> del azúcar que pudiera estar en posición 6'' ó 6'''. El espectro de RMN <sup>1</sup>H obtenido de la fracción KL se muestra en el Anexo 3.

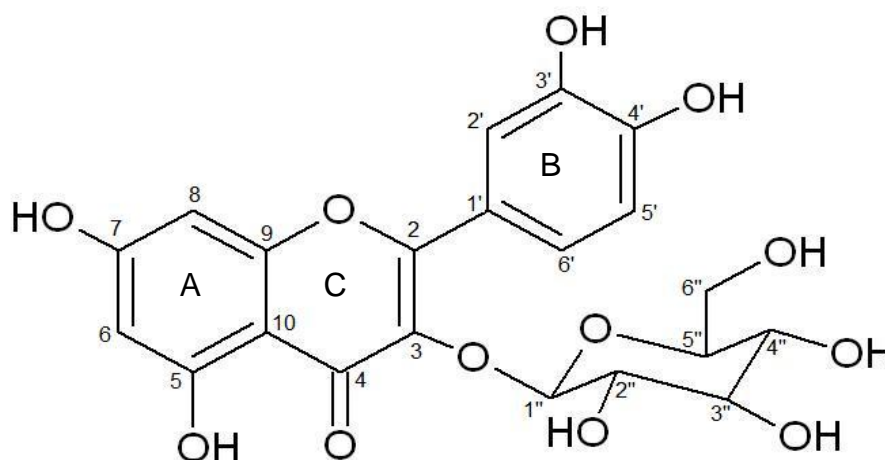


Figura 20. Estructura química del glucósido de quercetina (un flavonol glucosilado)

### 8.3 Resultados de pruebas farmacológicas

#### 8.3.1 Natación forzada

En la Figura 21, se observa que la administración intraperitoneal de 15 mg/kg del fármaco Imipramina (T12), indujo una disminución en el tiempo de inmovilidad de los ratones durante la prueba, lo cual fue indicativo de que la prueba funcionó bajo las condiciones empleadas. Este efecto fue significativamente diferente en comparación con el del grupo que sólo recibió el vehículo (T13, 227±31.76; T12, 41±67. F (2.50) < 8.198, p<0.001).

Los tratamientos T1, T2, T3, T6, T8 y T10 (200 mg/kg, vo) provocaron una disminución en el tiempo de inmovilidad de los ratones en el cilindro con agua (Figura 21), este efecto fue significativamente diferente con respecto al grupo control (T13, 227±31.76; T1, 131±57; T2, 128±33; T3, 64.5±20.4; T6, 79.8±79; T8, 80±29; T10, 75±58. F (2.50) < 8.198, p<0.001). Mientras que los tratamientos 4, 5, 7, 9 y 11 no provocaron cambios significativos (p>0.05) en el tiempo de inmovilidad (Tabla 22).

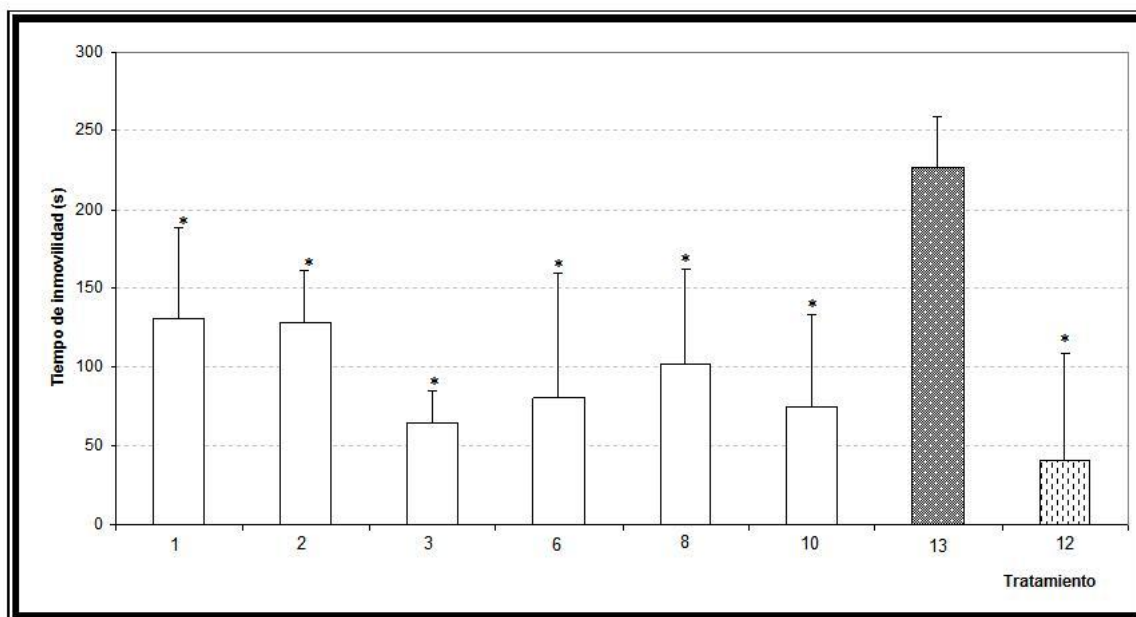


Figura 21. Tiempo de inmovilidad de ratones ICR en la prueba de NF. Administración oral (200 mg/kg) de 1= HA-hs, 2= FA, 3= FA-2, 6= I, 8= KL, 10= HA-hp; además 13= CMC 1%, 12= IMI (15 mg/kg, ip). ANOVA, post-prueba Bonferroni, \* =  $p < 0.05$  (media  $\pm$  desviación estándar).

Tabla 22. Resultados en la prueba de NF de diferentes fracciones provenientes de FA-2.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo de inmovilidad (s)
4 (B)	200	196 $\pm$ 12.7 <sup>a</sup>
5 (CDE)		179.5 $\pm$ 74.4 <sup>a</sup>
7 (J)		215 $\pm$ 44 <sup>a</sup>
9 (N)		201 $\pm$ 18.9 <sup>a</sup>
11 (Til)		132 $\pm$ 100 <sup>a</sup>
12 (IMI)	15	41 $\pm$ 67 <sup>b</sup>
13 (CMC 1 %)	100 $\mu$ L / 10 g peso	227 $\pm$ 73 <sup>a</sup>

a=  $p > 0.05$ , b=  $p < 0.05$ , Til= Tilirósido, IMI= Imipramina, CMC= Carboximetilcelulosa

### 8.3.2 Campo abierto

En esta prueba, los tratamientos T1, T6, T10, T12 y T13 (Figura 22) no provocaron cambios significativos en los cruces totales (T13, 69 $\pm$ 11; T12, 77 $\pm$ 26; T10, 57 $\pm$ 11; T1, 57 $\pm$ 21; T6, 65 $\pm$ 13;  $p = 2.72$ ), ni en el número de estiramientos verticales (T13, 145 $\pm$ 116; T12, 106 $\pm$ 50; T10, 131 $\pm$ 57; T1, 126 $\pm$ 42; T6;  $p > 0.05$ ). Estos resultados indican que los tratamientos no modifican la actividad motora espontánea de los ratones.

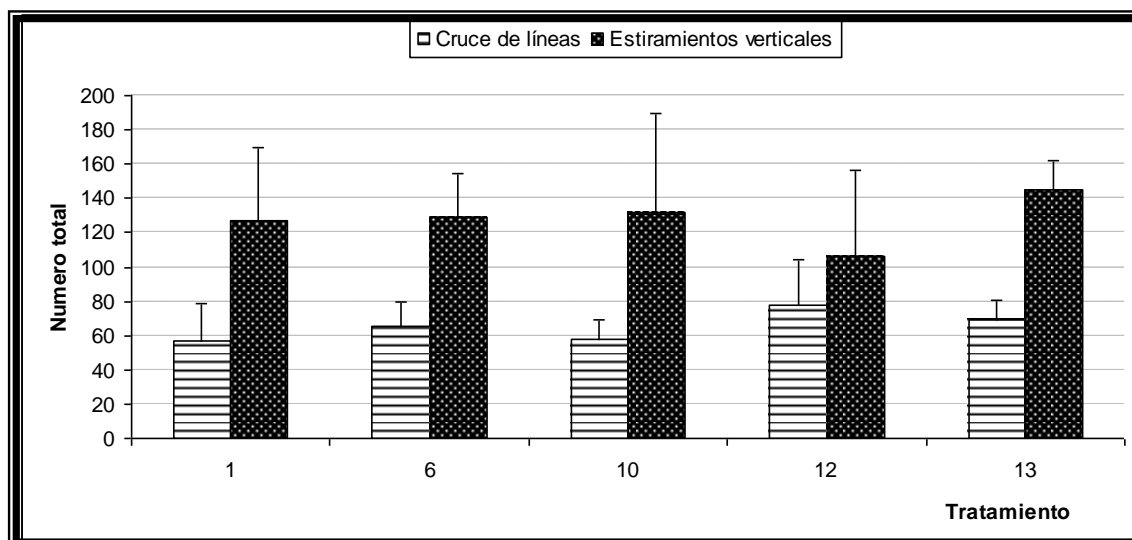


Figura 22. Cruce total y número de estiramientos verticales de ratones ICR en campo abierto. 1= HA-hs (200 mg/kg, vo), 6= I (200 mg/kg, vo), 10= HA-hp (200 mg/kg, vo), 12= Imipramina (15 mg/kg, ip), 13= CMC 1% (200 mg/kg, vo).

## 9. Discusión

Santiago (1998), encuentra que después de 70 días de cultivo de estacas de tila bajo condiciones controladas, éstas comienzan a presentar defoliación llevándolas a la muerte (en un 50 %), a los 107 días de cultivo este porcentaje se incrementa hasta un 80 %. En la presente investigación se identificó que la humedad relativa fue un factor determinante para el mantenimiento y desarrollo de las estacas de *T. americana* de tal forma que cuando se estableció el cultivo bajo condiciones de baja humedad relativa ( $27\pm 2\%$ , Tratamiento 1), el 63.2% de las estacas murió a la segunda semana. Cuando se llevó a cabo el cultivo bajo condiciones de alta humedad relativa ( $87.3\pm 2\%$ , Tratamiento 2), se logró un avance importante, el porcentaje de mortalidad en las estacas en la segunda semana fue considerablemente menor (16%) y de esta manera se alcanzó el 70% de estacas con brotes a los 2 meses de tratamiento, lo cual fue equiparable a los datos obtenidos por Santiago (1998). Hasta ahora en la literatura se reporta que la propagación de tila por estacas es difícil y el porcentaje de éxito es bajo. En la presente investigación y en trabajos previos se reporta que los cultivos por esqueje bajo condiciones controladas, son capaces de sobrevivir alrededor de 60-70 días en promedio, la muerte de las estacas se ha atribuido a que durante este periodo de tiempo las hojas empiezan a caer, o como sucedió durante este trabajo fueron cortadas para realizar los experimentos correspondientes. Cabe entonces, recordar que la fotosíntesis es un proceso fisiológico fundamental, por medio del cual las plantas transforman las sustancias inorgánicas que toman del medio en constituyentes vitales para su crecimiento y desarrollo. De tal manera que al no existir el principal órgano fotosintetizador (las hojas), las plantas consumen las reservas energéticas almacenadas en tallo y por no tener una fuente de carbono adicional, éstas mueren; lo cual puede ser el argumento por el cual las estacas del cultivo controlado de tila no sobrevivieron más tiempo. Una propuesta para superar este inconveniente es la aplicación de riego con una solución nutritiva que provea a las plantas los carbohidratos que en ese momento no puede biosintetizar por la falta de hojas.

En todo caso, se debe resaltar el éxito obtenido durante el proceso de cultivo de estacas de *T. americana*, permitió proveer de material vegetal para realizar las evaluaciones farmacológicas y químicas del extracto hidroalcohólico y sus fracciones. En este sentido los rendimientos del extracto hidroalcohólico obtenido de hojas de plantas silvestres (HA-hs, 6.34%) y cultivadas en invernadero (HA-hp, 5.68%) fueron similares. Lo que se debe resaltar a este respecto, es que el contenido de metabolitos secundarios de ambos extractos difiere considerablemente. Si bien ambos extractos comparten el tilirósido, este flavonoide está en diferentes concentraciones, presentando mayor abundancia en HA-hp, además este extracto tiene un número mayor de flavonoides. Los resultados de la presente investigación indican que el perfil químico del extracto HA-hp es similar al reportado para el de brácteas de plantas silvestres ([Herrera-Ruiz, 2008](#)), donde el tilirósido presenta un pico más grande que el grupo de flavonoles en donde identifican quercetina, quercitrina, canferol y rutina.

Esto es de suma importancia, debido a que las brácteas son órganos tardíos durante el desarrollo de los árboles de tilia (presentes una vez que se alcanza la madurez sexual), y solamente están disponibles en pocos meses en el año con la finalidad de reproducción, al emplear estas estructuras se limita el número de semillas y la posibilidad de la propagación vía sexual. Sin embargo, los metabolitos presentes en estos tejidos especializados también se encuentran en las hojas obtenidas por cultivo de estacas en invernadero. De obtenerse éxito en el mantenimiento del cultivo de tilia en condiciones de invernadero, esto representaría una alternativa para proveer de hojas, la cual tiene como ventaja que se dispondría de material vegetal suficiente para la producción de un fitomedicamento y se disminuiría o incluso abatiría el uso de material silvestre, ya que *T. americana* var. *mexicana* es una planta que se encuentra en peligro de extinción y la colecta y el manejo de ésta especie está restringido.

Los resultados conseguidos mediante las técnicas de CCF, HPLC y RMN de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna de la fracción FA-2 proveniente del HA-hs, evidencian la presencia de flavonoides como



compuestos mayoritarios, así como la presencia de un compuesto similar al ácido ursólico. Éste es un triterpeno que está distribuido ampliamente entre varias familias de plantas, el cual es común en las cubiertas cerosas de las hojas y algunos frutos. Estas cubiertas tienen función protectora contra el daño por factores bióticos y abióticos (Brielmann *et al.*, 2006; Frighetto *et al.* 2008). En estos extractos también se encuentra presente un fitoesterol con perfil cromatográfico similar al glucósido de  $\beta$ -sitosterol; los fitosteroles se distribuyen ampliamente en casi todas las partes de las plantas, pero sobre todo en semillas y retoños (Villaseñor *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2005).

Se demostró que el extracto HA-hs (T1), las fracciones FA y FA-2 (T2 y T3), así como las fracciones menos complejas I y KL (T6 y T8) provenientes de FA-2, disminuyen el tiempo de inmovilidad de los ratones en el cilindro con agua, lo cual sugiere que los flavonoides presentes en el extracto y sus fracciones son los responsables del efecto antidepresivo observado en el modelo de natación forzada, los resultados no fueron diferentes estadísticamente al grupo que recibió el control positivo, IMI (T12). El extracto HA-hp provocó un efecto antidepresivo, el cual es similar al obtenido por Maldonado-Abarca (2008) con el extracto hidroalcohólico de brácteas de plantas silvestres (ver Anexo 4), quién demuestra que la administración de 200 mg/kg vía oral provoca una disminución de la inmovilidad con respecto al control de aproximadamente 72 segundos. El HA-hp a la misma dosis provocó una inmovilidad de 75 segundos, esto nos indica que éste extracto no sólo tiene un perfil químico similar al de la bráctea, sino también el efecto biológico es semejante.

Al comparar el perfil fitoquímico entre los tratamientos que presentaron actividad antidepresiva se observa que éstos contienen compuestos con estructuras químicas muy similares, los cuales pertenecen a los grupos flavonas y flavonoles (agliconas y sus glucósidos). Ya se ha demostrado que en otras especies del género *Tilia* existe una gran abundancia de flavonoides; se ha logrado aislar, por ejemplo, al canferol de *T. tomentosa* (Viola *et al.*, 1994); diramnósido de canferol y diramnósido de quercetina de *T. argentea* con propiedades antiinflamatorias y analgésicas (Toker *et al.*, 2004). Diversos trabajos han demostrado que los flavonoides tienen una actividad

antidepresiva. Existen reportes de que el canferol (flavonol) presente en extractos de *Ginkgo biloba* inhibe a las enzimas MAO-A y MAO-B *in vitro* (White *et al.*, 1996; Sloley *et al.*, 2000); mientras que las flavonas apigenina y crisina y el flavonol quercetina mostraron un mejor efecto de inhibición sobre MAO-A (Sloley *et al.*, 2000). Herrera-Ruiz *et al.*, (2008) reportaron la presencia de canferol, quercetina (flavonoles), tilirósido, quercitrina, rutina (flavonol glucosídico), como los principales flavonoides presentes en un extracto de brácteas de *Tilia americana* var. *mexicana* con actividad ansiolítica. Recientemente, Machado *et al.* (2008) demostraron que rutina tiene un efecto antidepresivo evaluado en la prueba de suspensión por la cola en ratones y encontraron evidencia de que el mecanismo de acción involucra los sistemas de neurotransmisión serotoninérgico, noradrenérgico y/o dopaminérgico. Por otro lado, se ha demostrado que el tilirósido tiene importantes efectos biológicos, como inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa (Jung y Park, 2007), antioxidante, citotóxica (Rao *et al.*, 2007) y potente actividad anti-*Giardia lamblia* y antiamibiano (Calzada y Alanís, 2007) entre otros efectos. Sin embargo, a la fecha no se le ha atribuido algún efecto depresor del SNC. Debido a sus altas concentraciones en HA-hp, es probable que esta sustancia juegue un papel importante sobre el efecto antidepresivo causado por este extracto.

Los resultados indican que a pesar de que perfil químico de los extractos HA-hs y HA-hp son diferentes, es decir en el caso de HA-hs los compuestos con  $t_R$  menores son mayoritarios a los compuestos con  $t_R$  mayores (Tilirósido), mientras que el extracto HA-hp muestra el perfil inverso (compuestos con  $t_R$  mayores más abundantes, Tilirósido), ambos ejercen un efecto depresor del SNC, al igual que lo hacen las brácteas. Aunque el tilirósido por si solo no mostró un efecto antidepresivo evaluado en el modelo de natación forzada está presente en HA-hp, HA-hs y sus fracciones en donde se comprobó un efecto antidepresivo. Se ha demostrado que la rutina ejerce efectos antidepresivos en el modelo de suspensión por la cola, sin embargo al evaluarla en el modelo de natación forzada dicha actividad no se observa (Machado *et al.*, 2008). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Nölder y Schötz (2002) que demuestran que la rutina no presenta efecto antidepresivo en este modelo, sin

embargo la presencia de este flavonoide en el extracto hidroalcohólico de *Hypericum perforatum* es esencial para observar el efecto antidepresivo en la misma prueba etológica. Lo que lleva a suponer un sinergismo entre la rutina y los demás constituyentes del extracto (otros flavonoides); posiblemente incrementando directa o indirectamente la biodisponibilidad de los compuestos presentes en el extracto. En el presente trabajo se demostró que el tilirósido no ejerce un efecto antidepresivo por sí mismo, sin embargo en las fracciones activas de manera reiterativa se encuentra este flavonoides, lo que da lugar a suponer que el tilirósido y los demás flavonoides actúan de manera sinérgica en alguno de los sistemas de neurotransmisión involucrados con la depresión. Así, los resultados aquí obtenidos representan un avance importante sobre el estudio de *Tilia americana* var. *mexicana* y específicamente de su fracción FA-2 obtenida de hojas la cual es rica en flavonoides, ya que permite proponerla como una fuente alternativa de sustancias bioactivas candidata en el desarrollo de un fitomedicamento contra trastornos de depresión.

## 10. Conclusiones

Se logró el establecimiento de un cultivo en invernadero a partir de esquejes, el cual permitió la obtención de material biológico (HA-hp) para los estudios fitoquímicos y farmacológicos.

El extracto hidroalcohólico de hojas de plantas silvestres (HA-hs) y el de hojas de plantas cultivadas en invernadero (HA-hp) presentan perfil químico diferente.

El tilirósido se encuentra tanto en el extracto HA-hs como en el extracto HA-hp pero en concentraciones diferentes.

El flavonol rutina se encuentra presente sólo en el extracto hidroalcohólico de hojas de *T. americana* var. *mexicana* silvestre, pero no en las propagadas.

El extracto hidroalcohólico de hojas de *T. americana* tanto silvestre como propagada, poseen importantes propiedades antidepresivas en el modelo de natación forzada, sin modificar la actividad motora espontánea.

Fracciones químicamente menos complejas y con alto contenido de flavonoides, poseen efecto antidepresivo sin modificar la actividad motora espontánea.

Los resultados del presente trabajo demuestran que los extractos de hojas, silvestres y obtenidas en condiciones de invernadero tienen efecto antidepresivo, mismo que ha sido reportado para las brácteas. Esto es de gran relevancia, ya que las brácteas son las portadoras de los órganos reproductores y su depredación o sobre explotación ha ocasionado la erosión de las poblaciones de *Tilia americana* var. *mexicana*, la cual, es una planta en peligro de extinción.

## 11. Perspectivas

Realizar modificaciones al método empleado para el establecimiento del cultivo en invernadero de *Tilia americana* var. *mexicana*, considerando adicionar riegos con solución nutritiva que permitan disponer de material vegetal de una manera constante.

Continuar con la separación, elucidación de la estructura e identificación de los compuestos del tipo flavonoide presentes en la fracción FA-2 proveniente de HA-hs.

Evaluar la interacción entre los flavonoides e investigar el mecanismo de acción de los flavonoides responsables de la actividad antidepresiva.

Proponer métodos de obtención de la fracción activa de una forma más eficiente, para el proceso de desarrollo de fitomedicamentos.

## 12. Bibliografía

Aguirre-Hernández, E., Rosas-Acevedo, H., Martínez, A. L., Soto-Hernández, M., Moreno, J., González-Trujano, M. (2007). *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

American Psychiatric Association. (2000). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed, Text Revision*. American Psychiatric Association. Washington, U.S.A.

Argueta, A., Cano, L., Rodarte, M. (1994). *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*. Tomo III. Instituto Nacional Indigenista. D. F., México. pp. 1337

Bello G. (1993). *Plantas útiles no maderables en la Sierra Purépecha, Michoacán, México*, Boletín Técnico. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. 10:115

Bondy, B. (2002). *Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment*. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 4(1):7-20

Borsini, F., Meli, A. (1988). *Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity?* *Psychopharmacology* 94:147-160

Brands, S. J. (2008). *The Taxonomicon*. Universal Taxonomic Services, Amsterdam, The Netherlands. [<http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=6323&tree=0.1>]. Fecha de acceso: 27-Agosto-2008

Briemann, HL., Setter, WN., Kaufman, PB., Kirakosyan, A., Cseke, LJ. (2006). *Phytochemicals: The chemical components of Plants*. In: *Natural products from plants*. 2<sup>nd</sup> Ed. Cseke, LJ., Kirakosyan, A., Kaufman, PB., Warber, SL., Duke, JA., Briemann, HL. (eds). Ed. Taylor & Francis Group, LLC. Pp. 17

Calzada, F., Alanís, AD. (2007). *Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum**. *Phytotherapy Research*. 21: 78-80

Campos, M. M., Fernandes, E.S., Ferreira, J., Santos, A. R. Calixto, J. B. (2005). *Antidepressant-like effects of *Trichilia catigua* (Catuaba) extract: evidence for dopaminergic-mediated mechanisms*. *Psychopharmacology*. 182 (1):45-53

Carlini, E. (2003). *Plants and the central nervous system*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 75:501-512

Cheng, M. C., Li, C. Y., Ko, H. C., Ko, F. N., Lin, Y. L., Wu, T. S. (2006). *Antidepressant principles of the roots of *Polygala tenuifolia**. *Journal of Natural Products*. 69 (9):1305-1309

- Chen, Y., Han, T., Rui, Y., Yin, M., Qin, L., Zheng, H. (2005). *Effects of total triterpenes of Centella asiatica on the corticosterone levels in serum and contents of monoamine in depression rat brain*. Zhong Yao Cai. 28 (6):492-496
- Chen, Z., Yang, J., Tobak, A. (2008). *Designing new treatments for depression and anxiety*. IDrugs: The Investigational Drugs Journal. 11(3):189-197
- Coleta, M., Campos, MG., Cotrim, MD., Proenca, D. (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(1):S20- S21
- Cseke, L.J., Setzer, W.N., Vogler, B., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B. (2006). *Traditional, Analytical, and Preparative Separations of Natural Products*. pp:263-318. En: Cseke, L.J., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B., Warber, S.L., Duke, J.A., Brielmann, H.L. (ed.). Natural Products from Plants. Taylor & Francis Group, LLC. Florida, U.S.A.
- Dailly, E., Chenu, F., Renard, CE., Bourin, M. (2004). *Dopamine, depression and antidepressants*. Fundamental & Clinical Pharmacology 18:601–607
- Dhingra, D., Sharma, A. (2006). *Antidepressant-like activity of Glycyrrhiza glabra L. in mouse models of immobility tests*. Progress in Neuro Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 30 (3):449-459
- Duval, F., Lebowitz, B. D., Macher, J. P. (2006). *Treatments in depression. Dialogues in Clinical Neuroscience*. 8 (2):191-206
- Frighetto, RT., Welendorf, RM., Nigro, EN., Frighetto, N., Siani, AC. (2008). *Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography*. Food Chemistry. 106:767-771
- García-Delgado, A, Gastelurrutia, M. (2003). Bases Biológicas de la Depresión. pp. 7-12. En: *Guía de Seguimiento Farmacoterapéutico sobre Depresión*. Ed. Universidad de Granada. Granada, España.
- Geyer, MA., Markou, A. (2002). The role of preclinical models in the development of psychotropic drugs. pp 446-457. In: *Neuro Psychopharmacology. The Fifth Generation of Progress*. 5th Ed. American College of Neuropsychopharmacology. Kenneth, LD., Charney, D., Coyle JT., Nemeroff, C. (eds). Ed. Williams and Wilkins Publishers
- Hall, C.S. (1934). *Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality*. Journal of Comparative Psychology. 18, 385– 403

- Herrera-Ruiz, ML. (2008). *Evaluación de la actividad ansiolítica de Tilia americana var. mexicana (Schltdl.) Hardin y Ocimum basilicum Linn.* Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Herrera-Ruiz, M., García-Beltrán, Y., Mora, S., Díaz-Véliz, G., Viana, G. S., Tortoriello, J., Ramírez, G. (2006). *Antidepressant and anxiolytic effects of hydroalcoholic extract from Salvia elegans.* Journal of Ethnopharmacology. 107:53–58
- Herrera-Ruiz, M., Román-Ramos, R., Zamilpa, A., Tortoriello, J., Enrique Jiménez-Ferrer, J. (2008). *Flavonoids from Tilia americana with anxiolytic activity in plus-maze test.* Journal of Ethnopharmacology 118:312–317
- Hemby, S.E., Lucki, I., Gatto, G., Singh, A., Thornley, C., Matasi, J., Kong, N. Smith, J.E., Davies, H.M., Dworking, S.I. (1997). *Potential antidepressant effects of novel tropane compounds, selective for serotonin or dopamine transporters.* The Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics. 282 (2):727-733
- Hockok, L.G., Anway, J.C. (1972). *Morphological and chemical analysis of geographical variation in Tilia of eastern north America.* Brittonia. 1:2-8
- Hung, BR., Falero, A., Pérez, C., Tirado, S., Balcinde, Y., Pineda, M. (2005). *Fitosteroles. Parte 1. Tendencias actuales y aplicaciones biomédicas.* Revista CENIC Ciencias Biológicas. 36 (1):23-30
- Jung. M., Park, M. (2007). *Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from Agrimonia pilosa.* Molecules. 12: 2130-2139
- Kalkunte, S. S., Singh, A. P., Chaves, F. C., Gianfagna, T. J., Pundir, V. S., Jaiswal, A. K., Vorsa, N. Sharma, S. (2007). *Antidepressant and antistress activity of GC-MS characterized lipophilic extracts of Ginkgo biloba leaves.* Phytotherapy Research. 21 (11):1061-1065
- Kasper, S. (2005). *Clinical efficacy in depression.* pp:123-131. En: Müller, W. E. (ed.). *St. John's Wort and its Active Principles in Depression and Anxiety.* Birkhäuser Verlag. Basel, Switzerland
- Kennedy, S. (2006). *A review of antidepressant treatments today.* European Neuropsychopharmacology. 16:s619-s624
- Lee, S. A., Hong, S. S., Han, X. H., Hwang, J. S., Oh, G. J., Lee, K. S., Lee, M. K., Hwang, B. Y., Ro, J. S. (2005). *Piperine from the fruits of Piper longum with inhibitory effect on monoamine oxidase and antidepressant-like activity.* Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 53 (7):832-835
- Machado, DG., Bettio, LE., Cunha, MP., Santos, AR., Pizzolatti, MG., Brighente, IM., Rodrigues, AI. (2008). *Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from Schinus molle L. in mice: Evidence for the*



*involvement of the serotonergic and noradrenergic systems*. European Journal of Pharmacology. 587:163-168

Maldonado-Abarca, A. M. (2008). *Búsqueda de la actividad antidepresiva de diferentes plantas medicinales mexicanas sobre modelos animales de depresión*. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Zacatepec

Maletic, V., Robinson, M., Oakes, T., Lyengar, S., Ball, S.G., Russell, J. (2007). *Neurobiology of depression: an integrative view of key findings*. International Journal of Clinical Practice. 61 (12):2030-2040

Martínez, A. (2005). Flavonoides. Curso de Farmacognosia y Fitoquímica. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. [<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>]. Fecha de Acceso: 02- Noviembre-2008

Martínez M. (1969). *Las Plantas Medicinales de México*. D. F, México. Ed. Botas. pp. 317

Martínez M. (1979). *Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas*. Ed. Fondo de Cultura Económica. D. F, México. pp. 868, 1192

Martínez, S. M. (1987). *Plantas autóctonas y productos volcánicos de las inmediaciones de Morelia*. Biblioteca de Científicos Nicolaitas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 10

Martínez, M., Matuda, E. (1979). *Flora del Estado de México*. Ed. Biblioteca Enciclopédica del Estado de México. Tomos I y III. Estado de México, México. pp. 245, 246, 495

Matthews, K., Christmas, D., Swan, J., Sorrell, E. (2005). Animal models of depression: navigating through the clinical fog. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 29:503-513

McArthur, R., Borsini, F. (2006). *Animal models of depression in drug discovery: A historical perspective*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 84:436-452

Medina- Mora, M. E., Borges, G., Lara, C., Benjet, C., Blanco, J., Fleiz, C., Villatoro, J., Rojas, E., Zambrano, J., Casanova, L., Aguilar-Gaxiola, S. (2003). *Prevalencia de Trastornos Mentales y uso de servicios: Resultados de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México*. *Salud Mental*. 26 (4):1-16

Monroy-Ortiz, C., Castillo-España, P. (2007). *Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos*. Ed. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México. pp. 251, 253, 319

Moreno, J., Campos, M., Lara, C., Torner, C. (2005). *El sistema serotoninérgico en el paciente deprimido*. Primera parte. *Salud Mental*. 28 (6):20-26

- National Institute of Mental Health. (2004). Depresión.
- Nödler, M., Schötz, K. (2002). *Rutin is essential for the antidepressant activity of Hypericum perforatum extracts in the forced swimming test*. *Planta Medica*. 68:577-580
- Oswiecimska M, Bednarska D, Sgarkowska J. (1976) *Protoanthocyanidins (Leucoanthochanidins) in inflorescentia Tilia e*. *Herba Pol*; 22: 17-22
- Oswiecimska M, Bednarska D. (1976). *Photoetric determination of Leucoanthocanidin-Proanthocyanin*. *Herba Hung*. 15: 57-61
- Pacheco-Benítez, D. I. (2008). *Evaluación farmacológica en SNC sobre extractos de Tilia americana subespecie mexicana, variedad mexicana (Schtdl.) Hardin*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México
- Pae, C. U., Serretti, A., Patear, A. A., Masand, P. S. (2008). *Aripiprazole in the treatment of depressive and anxiety disorders: a review of current evidence*. *CNS Drugs*. 22(5):367-388
- Pavón, N. (2000). *An endangered and potentially economic tree of Mexico: Tilia mexicana (Tiliaceae)*. *Economic Botany*. 54 (1): 113-114
- Pérez-Ortega, G., Guevara-Fefer, P., Chávez, M., Herrera, J., Martínez, A., Martínez, A.L, González-Trujano, M.E. (2008). *Sedative and anxiolytic efficacy of Tilia americana var. mexicana inflorescences used traditionally by communities of State of Michoacán, Mexico*. *Journal of Ethnopharmacology*. 116: 461-468
- Pieters, L., Vlietinck, A. J. (2005). *Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds?* *Journal of Ethnopharmacology*. 100:57–60
- Porsolt, R. D., Bertin, A., Jalfre, M. (1977). *Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants*. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 229, 327–336
- Prut, L., Belzung, C. (2003). *The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review*. *European Journal of Pharmacology* 463: 3– 33
- Rao, YK., Geethangili, M., Fang, SH., Tzeng, YM. (2007) *Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: a comparative study*. *Food and Chemical Toxicology*. 45: 1770-1776
- Remick, R.A. 2002. *Diagnosis and management of depression in primary care: A clinical update and review*. *Canadian Medical Association Journal*. 167:1253-1260

- Santiago, D. (1998). *Estudio de algunos factores que afectan el enraizamiento de esquejes de Tilia mexicana Schl.* Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo
- Sayyah, M., Sayyah, M., Kamalinejad, M. (2006). *A preliminary randomized double blind clinical trial on the efficacy of aqueous extract of Echium amoenum in the treatment of mild to moderate major depression.* Progress in Neuro Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 30 (1):166-169
- Schatzberg, AF., Garlow, SJ., Nemeroff, CB. (2002). *Molecular and Cellular mechanisms in depression.* pp: 1040-1051. En: Neuropsychopharmacology. The fifth Generation of progress. 5th Ed. American College of Neuropsychopharmacology. Kenneth, LD., Charney, D., Coyle, JT. (eds). Ed. Williams and Wilkins Publishers. 2002
- Skoog, DA., Holler, FJ., Nieman, TA. (2001). *Espectroscopia de resonancia magnética nuclear.* pp: 481-536. En: Principios de Análisis Instrumental. 5ta. Ed. Skoog, DA., Holler, FJ., Nieman, TA. (eds). McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U. 2001
- Sloley, BD., Urichuk, LJ, Morley, P., Durkin, J. Shan, JJ., Pang, PK., Coutts, RT. (2000). *Identification of Canferol as a monoamine oxidase inhibitor and potencial neuroprotectant in extracts of Ginkgo biloba leaves.* Journal of Pharmacy and Pharmacology. 52:451-459
- Spencer, JN., Bodner, GM., Rickard, LH. (2000). *Análisis químico.* pp. 711-747. En. Química. Estructura y dinámica. 1ª Ed. Spencer, JN., Bodner, GM., Rickard, LH (eds). Ed. Grupo Patria Cultural, S. A. de C. V. 2000. D. F., México
- Toker, G., Kúpeli, E., Memisoglu, M., Yesilada, E. (2004). *Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatoty activities from the leaves of Tilia argentea (silver linden).* Journal of Ethnopharmacology. 95: 393-397
- Torres, G. (2006). *The dopamine transporter proteome.* Journal of Neurochemistry. 97 (1):3-10
- Villaseñor, IM., Angelada, J., Canlas, AP., Echevoyen, D. (2002). *Bioactivity Studies on  $\beta$ -Sitosterol and its glucoside.* Phytotherapy research. 16 (5):417-421
- Viola, H., Wolfman, C., Levi de Stein, M., Wasowski, C., Pena, C., Medina, J.H., Paladini, A. C. (1994). *Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from Tilia tomentosa (Tiliaceae).* Journal of Ethnopharmacology. 44:47-53
- Volák, J., Stodola, J. (1990). *Plantas Medicinales.* Susqueta. Praga, Checoslovaquia. pp. 319
- White, HK., Scates, PW, Cooper, BR. (1996). *Extracts of Ginkgo biloba leaves inhibit monoamine oxidase.* Life Science. 58 (16):1315-1321

Wichtl, M. (2004). Herbal drugs and phytopharmaceuticals. A handbook for practice on a scientific basis. Medpharm Scientific Publishers. Stuttgart CRC Press. Germany. pp. 611-613

World Health Organization. (2001). The World health report: 2001: Mental health : new understanding, new hope. Geneva, Switzerland

World Health Organization. (2003). Investing in mental health. Geneva, Switzerland

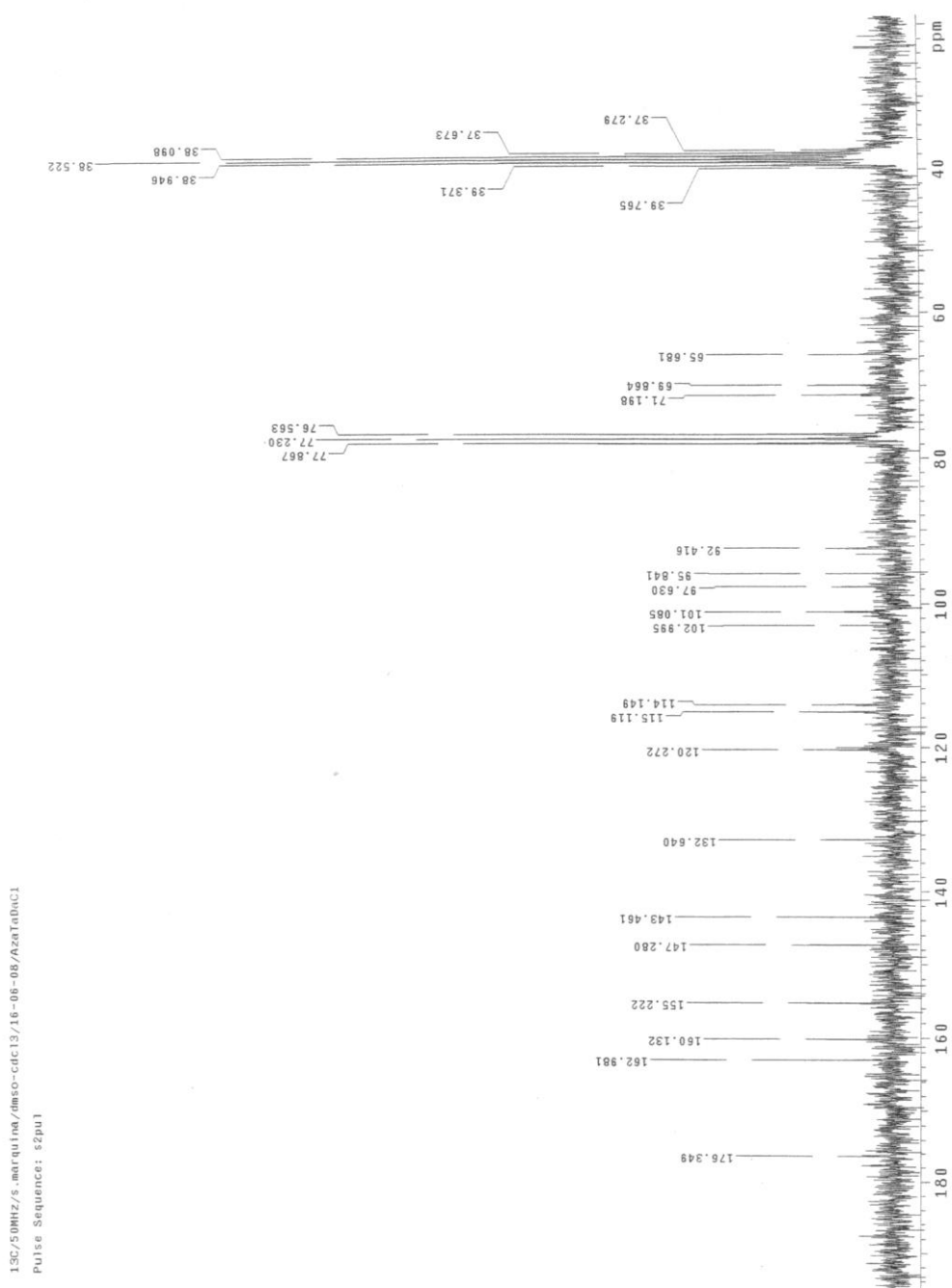
Zhang, Z. (2004). *Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders*. Life Sciences. 75: 1659 – 1699

Zub, MR. (1972). *Flavonoid Glycosides of Linden*. Farmatsevtichnyĭ Zhurnal. 27: 86-87

### 13. Anexos

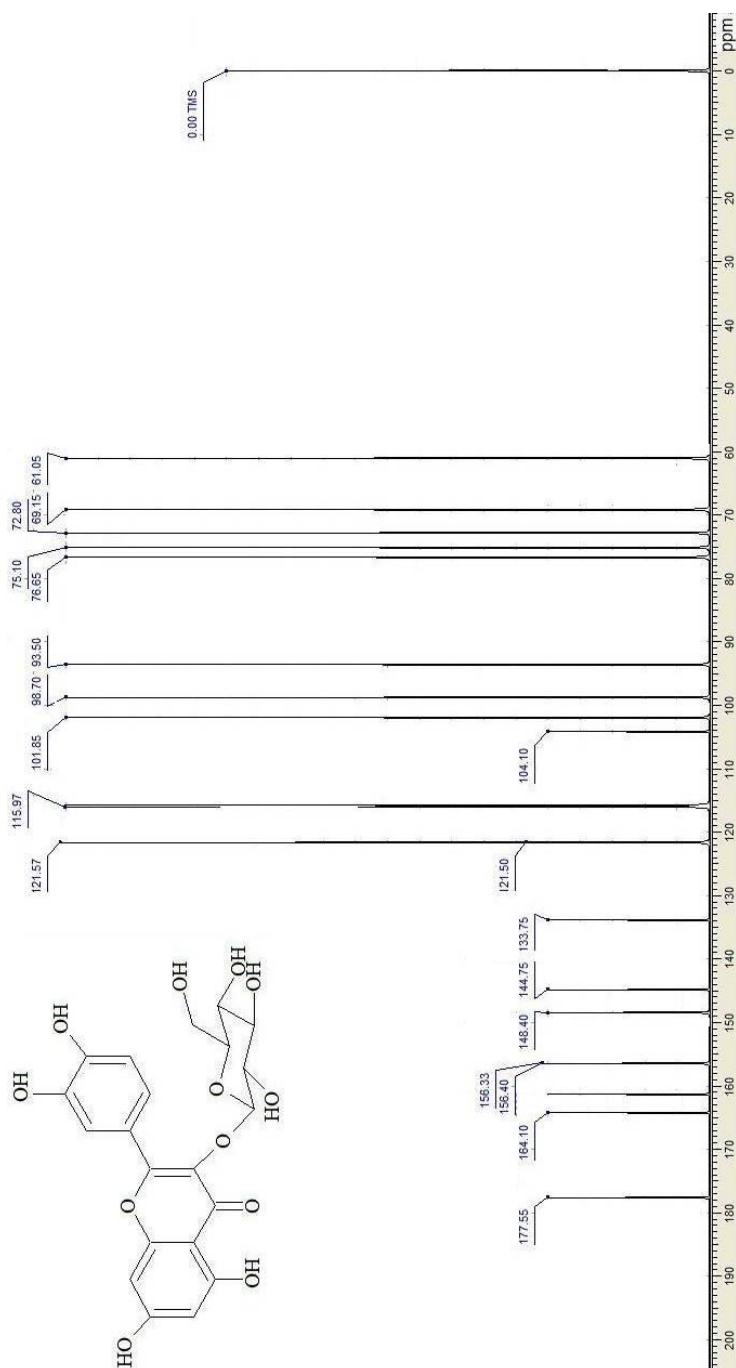
Anexo 1. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  obtenido de la fracción 10 obtenida por cromatografía en columna de la fracción FA-2.

El compuesto fue identificado como glucósido de quercetina.



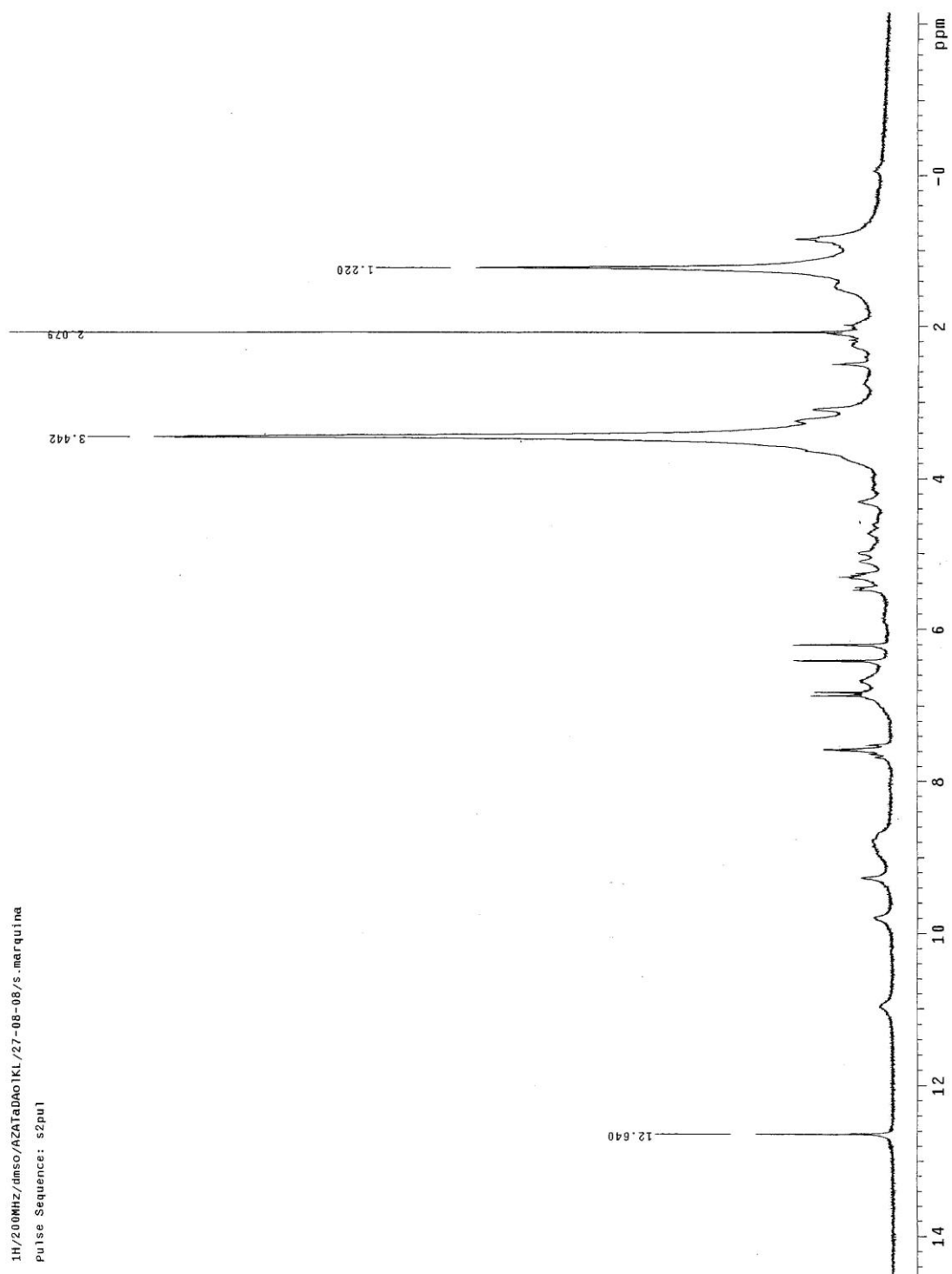
Anexo 2. Espectro teórico de RMN  $^{13}\text{C}$  de glucósido de quercetina

El espectro teórico de RMN  $^{13}\text{C}$  y los valores de  $\delta$  fueron obtenidos con el software ACD/CNMR Predictor<sup>®</sup> v. 5.0.



Anexo 3. Espectro experimental de RMN  $^1\text{H}$  de la fracción KL

El compuesto presente no pudo ser identificado, sin embargo presenta valores de  $\delta$  característicos del grupo de los flavonoles glucosilados.



## Anexo 4.

Experimentos de natación forzada, realizados para evaluar el efecto antidepresivo de bráctea del árbol Silvestre de *T. americana*, este trabajo fue realizado en el CIBIS-IMSS por Maldonado-Abarca, 2008 quién demuestra que el extracto hidroalcohólico de éste tejido tiene importantes propiedades antidepresivas (publicado con permiso del autor).

