



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la actividad ansiolítica de extractos orgánicos de *tilia americana* var. *mexicana*

Reporte de Apoyo a la Investigación

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ò L O G A

P R E S E N T A:

Leticia Acosta Torres



**Dra. Patricia Guevara Fefer
2011**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A Paulina y Juan Pablo por motivarme a seguir adelante con este trabajo

A mis hermanos Guadalupe y Miguel por su apoyo moral

A mis padres por su confianza

A mi cuñado por su ayuda incondicional

A mi amigo Víctor Ricardo por su asesoría y amistad incondicional

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme hacer mi trabajo de Investigación

Al Instituto Mexicano de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo.

Al Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM.

A la Dra. Patricia Guevara Fefer por su apoyo.

A la Dra. Ma. Eva González Trujano por su colaboración en esta investigación.

A la Dra. Eva Aguirre Hernández por su paciencia y dedicación a este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por su entusiasmo

AGRADECIMIENTOS

1. Datos del alumno

Acosta

Torres

Leticia

56-35-25-44

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

08537473-3

1. Datos del tutor

Dra.

Patricia

Fefer

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Manuel

Miranda

Anaya

4. Datos del sinodal 2

M. en C.

Abigail

Aguilar

Contreras

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Patricia

Guevara

Fefer

6. datos del sinodal 4

Dr.

René de Jesús

Cárdenas Vázquez

7. datos del sinodal 5

Dra.

Eva

Hernández

CONTENIDO

1. INTRODUCCION.....	1
2. 1 ANTECEDENTES.....	2
2.1.1 Sistema Nervioso Central (SNC).....	2
2.1.2. Neuronas y tipo de sinapsis.....	2
2.1.3.. Neurotrasmisores.....	4
2.4. La ansiedad como alteración del SNC.....	6
2.5 Clasificación y epidemiología.....	7
3 Botánica.....	9
3.1 Descripción botánica del género <i>Tilia</i> L.	
3.1.1 Ubicación taxonómica.....	9
3.2 Distribución del género <i>Tilia</i> en México.....	3
3.3 Etnobotánica	
3.4. Uso del género <i>Tilia</i>	4.
3.5. Metabolitos secundarios presentes en el género <i>Tilia</i>	5
4. JUSTIFICACION.....	7
5.. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
5.1. Diagrama general de trabajo	8
5.2. Sitios de colecta de material vegetal.....	9
5.3. Determinación de la actividad ansiolítica.....	10
5.3.1. Animales utilizados en los modelos experimentales	10

5.3.2 Preparación de los extractos y fármacos.....	10
5.3.3.Potenciación de la hipnosis inducida por pentobarbital sódico (PS)	11
5.3.4. Evaluación de la actividad exploratoria.....	11
5.3.5 Efecto ansiolítico/sedante	11
5.3.6. Análisis estadístico.....	12
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
6.1. Rendimiento de los extractos.....	13
6.2. Identificación de metabolitos secundarios de <i>T americana</i> var. <i>mexicana</i> de los dos sitios de colecta por (CCF)	14
6.3 Potenciación de la hipnosis inducida por pentobarbital sódico (PS).....	16
6.4 Efecto ansiolítico y actividad exploratoria de los tres extractos de Morelos administrado por via i.p	17
6.5. Efecto ansiolítico y actividad exploratoria de los tres extractos de Puebla administrados por via i.p	18
7. CONCLUSIONES.....	21
8 .REFERENCIAS.....	22

1. INTRODUCCIÓN

En México, la ansiedad ocupa uno de los primeros lugares de padecimientos del sistema nervioso central (SNC) y su frecuencia tiende a incrementarse debido a los factores estresantes ambientales y a los problemas socioeconómicos actuales. Estos trastornos afectan entre el 5 y 10% de la población (Rodríguez-Landa y Contreras, 1998). Algunos fármacos utilizados en su tratamiento, a pesar de ser efectivos, producen efectos colaterales tales como náuseas, dolor de cabeza, sedación, tolerancia y dependencia. Por ello, surge la necesidad del uso de nuevas alternativas terapéuticas.

Una estrategia de búsqueda de nuevos agentes ansiolíticos es la evaluación de compuestos de origen natural. Asimismo, como resultado de esta estrategia se han recomendado como clínicamente eficaces, los extractos de *Ginkgo biloba*, *Piper methysticum*, *Passiflora incarnata*, *Hypericum perforatum* y *Melissa officinalis*, actualmente utilizados en el tratamiento de la demencia, insomnio, ansiedad y depresión (Wong et al., 1998).

En varias comunidades de la República Mexicana es común el uso de plantas medicinales para tratar padecimientos a nivel de Sistema Nervioso Central. Tal es el caso de *Tilia americana* var. *mexicana* utilizada principalmente para estrés, e insomnio (Aguilar et. al., 1994, Arqueta et. al., 1994).

Considerando los reportes del uso de las tilias en la medicina tradicional mexicana y la variabilidad morfológica, fitoquímica y farmacológica que pueden presentar en relación a las condiciones ambientales de los sitios de desarrollo, en este estudio se abordó una comparación de la composición de terpenoides y flavonoides de extractos orgánicos y la evaluación del efecto ansiolítico y/o sedante de tilias colectadas en Morelos y Puebla.

2. ANTECEDENTES

2.1. Sistema Nervioso Central (SNC)

El SNC está formado por el cerebro y la médula espinal. Se denomina central en relación con el sistema nervioso autónomo (SNA), periférico (SNP) o vegetativo formado por los ganglios raquídeos y los nervios que salen y llegan de la médula y de los ganglios por una parte, y por la otra del sistema nervioso motor, que incluye los nervios que controlan los músculos esqueléticos (Brailowsky, 1998).

A pesar de la complejidad del sistema nervioso, solo está formado por dos tipos de células: neuroglia y neuronas. La neuroglia sostiene, nutre y protege a las neuronas. Las neuronas son las responsables de la mayoría de las funciones especiales atribuidas al sistema nervioso: sensibilidad, pensamiento, memoria, control de la actividad muscular y regulación de las secreciones glandulares (Tortora y Grabowski, 1999).

2.2. Neuronas y tipos de sinapsis

El SNC está formado por más de 100 000 millones de neuronas, las cuales transmiten señales. Como todas las células, las neuronas están formadas por una membrana, citoplasma, núcleo y organelos celulares. Difieren del resto de las células en que no son capaces de reproducirse y son excitables (Tortora y Grabowski, 1999).

Hasta hace muy pocos años se afirmaba que el cerebro nacía con la dotación definitiva de células y que éstas sólo podían morir pero nunca renovarse. Sin embargo, ahora el concepto ha estado cambiando al comprobarse en animales de experimentación (desde pájaros a ratas y primates) que la neurogénesis puede ocurrir normalmente. El sistema nervioso durante mucho tiempo fue considerado un sistema rígido, pero esta plasticidad alimenta la esperanza de los investigadores que ven en la regeneración neuronal una posibilidad terapéutica en el tratamiento de enfermedades como el Parkinson y el Alzheimer o para inducir reparaciones de la médula espinal cuando ésta haya sido dañada por algún traumatismo. Al confirmar

que la neurogénesis puede ocurrir en diversas zonas del cerebro de diversos animales, tanto de manera natural como en respuesta a distintas lesiones, marca la posibilidad de que los trasplantes de neuronas funcionen y aumenta el interés por encontrar cómo promover la neurogénesis de manera artificial, actuando sobre los genes, proteínas y factores tróficos que la regulan (Arias-Carrión y Drucker-Colín, 2007).

La mayoría de las neuronas están formadas por tres elementos básicos: 1) cuerpo celular o soma, 2) dendritas y 3) axón. En el soma o cuerpo se encuentra el núcleo que contiene toda la información genética. Las dendritas son prolongaciones cortas, con un grosor que disminuye gradualmente hacia sus extremos y son muy ramificadas. El axón es una prolongación fina y cilíndrica y puede ser larga o corta. Los axones pueden o no estar cubiertos de una sustancia llamada mielina que le sirve de aislante y que influye sobre la velocidad de conducción. Funcionalmente hablando, el papel de cada uno de estos elementos es diferente. La información se recibe siempre en las dendritas o en el soma y se envía a través del axón (Tortora y Grabowski, 1999).

Para clasificar las distintas neuronas del cuerpo se utilizan sus características estructurales y funcionales. La clasificación estructural se basa en el número de proyecciones que salen del cuerpo de la célula. Las neuronas multipolares tienen varias dendritas y un solo axón. Las neuronas bipolares sólo tienen una dendrita y un axón. Las neuronas unipolares tienen una sola proyección que sale del cuerpo neuronal (Tortora y Grabowski, 1999).

La dirección en que se transmiten los impulsos nerviosos es la base de la clasificación funcional de las neuronas. Las neuronas aferentes transmiten los impulsos nerviosos sensitivos desde los receptores de la piel, órganos de los sentidos, los músculos, las articulaciones y las vísceras hacia el encéfalo y la médula espinal. Las neuronas eferentes conducen los impulsos nerviosos motores desde el encéfalo y la médula espinal a los efectores, que pueden ser músculos o glándulas. Las neuronas de asociación o interneuronas transportan los impulsos nerviosos desde una neurona a otra (Tortora y Grabowski, 1999).

La transmisión de la información de una neurona a otra en el interior del sistema nervioso se da en la sinapsis o unión entre neuronas. Existen dos clases de sinapsis: 1) la sinapsis química y 2) la sinapsis eléctrica.

Casi todas las sinapsis que se utilizan para transmitir señales en el SNC del ser humano son sinapsis químicas. En ellas, la primera neurona secreta en la sinapsis una sustancia química llamada neurotransmisor, y éste, a su vez, actúa sobre un receptor de la siguiente neurona para excitarla, inhibirla, o modificar su sensibilidad. En la sinapsis química sólo hay transferencia de la información en un sentido, desde la neurona presináptica a la postsináptica. En cambio, las sinapsis eléctricas, se caracterizan por ser canales directos que transmiten impulsos eléctricos desde una célula a la siguiente. La mayoría de ellas constan de pequeñas estructuras tubulares formadas por proteínas y que se llaman uniones intercelulares laxas, las cuales permiten el paso libre de los iones desde dentro de una célula a la siguiente. La corriente puede fluir en ambos sentidos y rápidamente (Drucker, 2005). Cabe mencionar que la conducción a lo largo de una célula nerviosa es eléctrica, por medio del intercambio rápido de iones cargados a través de la membrana.

2.3 Neurotransmisores

Tanto en el SNC como en el SNP existen neurotransmisores excitadores e inhibidores. A veces el mismo neurotransmisor tiene un efecto excitador en unas localizaciones e inhibidor en otras. La respuesta que se produce depende de la naturaleza del receptor que capta al neurotransmisor (Tortora y Grabowski, 1999).

Los neurotransmisores son sustancias químicas liberadas por una célula nerviosa en la sinapsis, capaz de alterar el funcionamiento de otra célula de manera breve o durable, por medio de la ocupación de receptores específicos y por la activación de mecanismos iónicos o metabólicos (Brailowsky, 1998). Para que una molécula sea considerada como neurotransmisor debe reunir los siguientes criterios: 1) ser sintetizada dentro de la neurona que la libera; 2) el neurotransmisor es almacenado en vesículas presinápticas y es liberado para ejercer una acción definida sobre

la neurona postsináptica; 3) efectos del neurotransmisor sobre el receptor. Una vez liberado el neurotransmisor debe cruzar el espacio sináptico y unirse al receptor en la membrana postsináptica y estimularla y 4) la inactivación del neurotransmisor. Mientras el neurotransmisor permanezca unido al receptor, la estimulación continúa, por lo tanto una vez estimulado el receptor, el compuesto debe ser inactivado (Drucker, 2005).

Las sustancias que actúan como neurotransmisores son, en general, moléculas orgánicas sencillas, de bajo peso molecular. En el SNC los más comunes se enlistan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Neurotransmisores y su acción en el SNC

Neurotransmisor	Acción en el SNC
<p>Monoaminas:</p> <p style="padding-left: 40px;">Acetilcolina</p> <p style="padding-left: 40px;">Dopamina</p> <p style="padding-left: 40px;">Norepinefrina</p> <p style="padding-left: 40px;">Serotonina (5-HT)</p>	<p>Transmisión neuromuscular, sueño y alertamiento</p> <p>Movimiento voluntario, alertamiento emocional, aprendizaje y memoria</p> <p>Sueño y alertamiento, control de ingesta, emoción y afecto, aprendizaje y memoria</p> <p>Sueño, emoción y afecto, control de ingesta, regulación de la temperatura corporal</p>

Noradrenalina	Emoción y afecto (depresión)
<p>Aminoácidos:</p> <p>GABA (ácido gama-amino-butírico)</p> <p>Ácido glutámico</p> <p>Glicina</p>	<p>Neurotransmisor inhibitorio</p> <p>Neurotransmisor excitatorio</p> <p>Neurotransmisor inhibitorio</p>
<p>Neuropéptidos:</p> <p>Sustancias P</p> <p>Metencefalina</p> <p>Leuencefalina</p> <p>Somatostatina</p>	<p>Sustancias involucradas en numerosas funciones fisiológicas como por ejemplo el dolor, estrés y analgésicos internos</p>

Fuente: Neal, 1992; Tresguerres, 1992; Corsi, 1996.

2.4 La ansiedad como una alteración del SNC

La ansiedad es una emoción normal en circunstancias amenazadoras, y se considera que forma parte de la reacción evolutiva de supervivencia de "lucha o huida". Sin embargo, hay circunstancias en las que la presencia de ansiedad constituye

una mala adaptación y un trastorno psiquiátrico. Cuando la ansiedad es normal, nos alerta y protege; cuando es patológica, nos causa sufrimiento, y en casos extremos nos recluye e invalida socialmente (Pérez de la Mora, 2003).

La ansiedad se define como una sensación de desasosiego que incluye agitación, inquietud, zozobra, estrés, molestia, cuyo origen es indefinido, es decir, carece de una fuente u origen externo. Se considera la ansiedad como sinónimo de angustia (Brailowsky, 1998). Por otra parte, Cedric et al. (1997) define la ansiedad como un complejo de sensaciones subjetivas y conductas características. Las sensaciones subjetivas consisten en tensión, aprensión, temor, preocupación y dificultad para pensar o concentrarse. Estas sensaciones, en general, se acompañan de signos o síntomas de la conducta como temblores, estremecimientos, tensión muscular, desasosiego y fatiga, con hiperactividad autonómica de los aparatos respiratorio, cardiovascular, urinario y gastrointestinal (Cedric et al., 1997).

2.5. Clasificación y epidemiología

Los trastornos por ansiedad son frecuentes y su presencia tiende a incrementarse debido a factores estresantes ambientales y a los problemas socioeconómicos actuales. Estos trastornos afectan entre el 5 y 10% de la población general. La ansiedad puede afectar a cualquier persona, pero es más frecuente en las mujeres que en los hombres (3:1). Se caracteriza por variados síntomas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Síntomas característicos de los trastornos por ansiedad

ESTADO	CARACTERÍSTICAS
Tensión motora	Temblor, tensión o dolor muscular, inquietud y fatiga excesiva
Hiperactividad vegetativa	Sensación de ahogo, taquicardia, manos frías o húmedas, boca seca, mareo, escalofrío, micción frecuente y sensa-

	ción de tener un nudo en la garganta
Hipervigilancia	Sentirse atrapado, exageración en la respuesta de alarma, dificultad para concentrarse, insomnio e irritabilidad

Fuente: Rodríguez-Landa y Contreras, 1998.

Los trastornos por ansiedad, dependiendo de la intensidad y duración de sus síntomas se clasifican en la Tabla 2..

Cuadro 2. Clasificación de los trastornos por ansiedad

Tipo de trastorno	Síntomas característicos	Porcentaje en la población
Angustia sin agorafobia	Crisis de angustia recurrente e inesperadas que causan preocupación permanente	0.8-1%
Angustia con agorafobia	Crisis de angustia y agorafobia de carácter recurrente e inesperado que causan ansiedad	1.2-3.8%
Fobia específica	Ansiedad como respuesta a la exposición a situaciones u objetos específicos temidos, que conllevan a comportamiento de evitación	4.1-7.7%
Fobia social	Ansiedad como respuesta a situaciones sociales o actuaciones en público	1.7-2%
Trastorno obsesivo compulsivo (T.O.C.)	Obsesiones que causan ansiedad, malestar y compulsiones cuyo propósito es neutralizar dicha ansiedad	1.6-2.5%
Trastorno de ansiedad generalizada (T.A.G.)	Ansiedad y preocupación de carácter excesivo y persistente durante al menos seis meses	6.4-7.6%
Estrés postraumático	Ansiedad ante la reexperimentación de eventos traumáticos y comportamiento de evitación hacia estímulos relacionados con el trauma	1%

3.1. Descripción botánica del género *Tilia* L.

La primera referencia que se tiene sobre el género *Tilia* en México es la descripción de *Tilia mexicana* hecha por el botánico alemán Schlechtendal en 1837, quien se basó en ejemplares colectados por Schiede en Cuesta Grande de Chiconquiaco, Veracruz (Bush, 1929).

Las tilias son árboles de madera blanca y blanda. Tallos con pubescencia de tricomas simples y estrellados, glabrescentes. Hojas con láminas ovadas, oblongo-lanceoladas o elípticas, 5-nervadas, con pubescencia de tricomas simples y estrellados, de consistencia papirácea, ápice acuminado, margen aserrado o dentado-mucronado, base cordada, obtusa u oblicua; estípulas caducas. Inflorescencia dispuesta en cimas terminales o axilares, pedunculadas, acompañadas por una bráctea foliácea, membranácea, oblonga. Cáliz con 5 sépalos, ligeramente cuculados en botón, libres, verdes, ovados, estrellado-pubescentes, ápice acuminado; corola con 5 pétalos, libres, blancos o amarillos, glabros; estambres numerosos, connados en la base; filamentos simples; anteras dorsifijas, con 5 estaminodios, petaloides; gineceo 5-carpelar; ovario globoso, 5-locular, con pubescencia de tricomas simples y estrellados, 2 óvulos por lóbulo, estigma 5-lobado, placentación axilar. Fruto una nuez, globosa, densamente estrellado-pubescente; pedicelo estrellado-pubescente. Semillas 1 ó 2 por lóbulo, obovoides, negras. Número cromosómico $2n = 82$ (Hardin, 1990).

2.1.2. Ubicación taxonómica

En el reino vegetal se calcula que existen cerca de 250,000 especies de plantas superiores, de las cuales las angiospermas comprenden aproximadamente 220,000 especies (Balandrin et al., 1993). La clase Magnoliopsida (dicotiledónea) está representada por 165,000 especies de hierbas, arbustos y árboles. La subclase Dilleniidae comprende 13 órdenes, 78 familias y cerca de 25,000 especies e incluye al orden Malvales que abarca 5 familias y 3,500 especies; en este orden se ubica la familia Tiliaceae, con aproximadamente 50 géneros y 450 especies (Cronquist, 1988), que alberga al género *Tilia* con 50 especies.

Bush (1929) reportó 15 especies de *Tilia* en México, considerando características morfológicas de la hoja como son: forma y tamaño de la lámina, longitud del pecíolo, tipo de base, margen, ápice y variación de la pubescencia

1. *Tilia mexicana*
2. *T. floridana*
3. *T. pringlei*
4. *T. ambigua*
5. *T. rotunda*
6. *T. coahuilana*
7. *T. nelsoni*
8. *T. longipes*
9. *T. occidentalis*
10. *T. houghi*
11. *T. moreliana*
12. *T. sargentiana*
13. *T. roseana*
14. *T. pertomentosa*
15. *T. arsenei*

Jones (1968), con base en diferencias en la cantidad y tipo de pubescencia en el envés de la hoja, agrupa a todas las *Tilias* mexicanas en una sola especie: *Tilia mexicana*. Posteriormente, Hardin (1990), reduce el número de especies de Estados Unidos y México a solamente una: *Tilia americana* con cuatro variedades (*americana*, *heterophylla*, *caroliniana* y *mexicana*). Por lo tanto, únicamente *Tilia americana* L. var. *mexicana* es conocida para México. Hardin considera que las características morfológicas vegetativas presentan una alta plasticidad fenotípica como una respuesta a factores del ambiente. Por ello, su clasificación se basa en la morfología de tricomas, ya que dicha morfología esta controlada genéticamente, y por ello proporciona la mejor evidencia para reorganizar los taxa. De esta forma actualmente se considera que el género *Tilia* esta conformado por 24 especies, de

las cuales 17 se distribuyen en Asia, 6 en Europa y 1 en Norteamérica (Tang Ya y Zhuge Ren, 1996).

2.1.3. Distribución del género *Tilia* en México

Las especies del género *Tilia* se distribuyen principalmente en zonas templadas de Europa y Asia, con pocas especies en Norteamérica y México.

En México *T. americana* var. *mexicana* crece en bosque mesófilo de montaña, es un árbol no muy abundante y se localiza en 16 estados: Chihuahua, Durango, Coahuila, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Puebla, Estado de México, San Luis Potosí, Querétaro, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Tamaulipas y Veracruz (Hardin, 1990; Revisión de herbario del Instituto de Biología: MEXU).

2.2. Etnobotánica

La mayoría de los usos de los árboles del género *Tilia* son reportados para las especies europeas. Pero en México, las tilias han sido aprovechadas de muy diversas maneras. Se les utiliza para aliviar cólicos menstruales, para purificar la sangre, males del corazón, resfriados, bronquitis, epilepsia, inflamaciones abdominales, vómito, tos, fiebre por infección, presión arterial, afecciones reumáticas, enfermedades del riñón, tensión nerviosa, estrés, insuficiencia renal o hepática, cicatrizante, etc. (Martínez, 1969; Estrada 1985; Aguilar et al., 1994; Argueta et al., 1994).

En estudios etnobotánicos se menciona que existen especies de dos familias conocidas con los mismos nombres comunes de Flor de tila, Flor de tilia y tilia, e incluso se reportan con las mismas propiedades medicinales, principalmente ansiolíticas y sedantes. Las especies de la familia Theaceae empleadas para estos tratamientos pertenecen al género *Ternstroemia* y las especies de la familia Tiliaceae son del género *Tilia*.

Fuente: Rodríguez-Landa y Contreras, 1998; Echeburúa, 1995.

2.4. Uso del género *Tilia*

En México, las tilias han sido aprovechadas de muy diversas maneras. Se les utiliza principalmente en la medicina tradicional para tratar "cólicos menstruales, para purificar la sangre, males del corazón, resfriados, bronquitis, epilepsia, inflamaciones abdominales, vómito, tos, fiebre por infección, presión arterial, afecciones reumáticas, enfermedades del riñón, tensión nerviosa, estrés, insuficiencia renal o hepática, cicatrizante, para combatir padecimientos nerviosos e insomnio" (Martínez, 1969; Estrada 1985; Aguilar et al., 1994; Arqueta et al., 1994). También se emplean como analgésicas, antibacteriales, antiedémicas, antiespasmódicas y antiinflamatorias (Duke et. Al., 2002). La forma más común de consumirla es tomando la infusión de flores.

Los nombres comunes para esta especie son: sirimo, tila, álamo, dirimo cirimo, cirimbo, tirimo, pata de vaca, haya, wasimia, wasimilla, tzírimo, jonote, achique, flor de tilia, tila de hos, vaca y yaco (Martínez, 1969; Estrada 1985; Aguilar et al., 1994; Arqueta et al., 1994).

Las propiedades medicinales se asocian con la presencia de principios activos como los flavonoides, terpenoides y compuestos volátiles (Toker et al., 2001).

2.5. Metabolitos secundarios presentes en el género *Tilia*.

La mayoría de los estudios sobre la composición química del género *Tilia* son de especies europeas en las que se han identificado terpenoides, ácidos fenólicos y flavonoides de flores, brácteas y hojas (Tzakou et al., 1987; Pietta et al., 1993; Viola et al., 1994; Buchbauer et al., 1995; Toker et al., 2001; Matsuda et al., 2002).

En 1987 Tzakou et al. identificaron cinco flavonoides (quercitrina, kaenferol, hiper-oxido, isoquercitrosido y astragalosido) de las inflorescencias de *T. tomentosa* Moench (sin *T. argentea*).

En 2001 y 2004, Toker et. al. aislaron compuestos de naturaleza flavonoide de flores, brácteas y hojas de *P. platyphyllos*, *T. rubra* y *T. argétea* (Tabla 3).

En México los estudios de *Tilia americana* var. *mexicana* reportan la presencia de los siguientes compuestos: heptacosano, ácido palmítico, β .sitosterol, kaenferol, quercetina y varios de sus glicósidos como isoquercitrina, astragalina, quercitrina, tilirósido, rutina, etc. (Aguirre-Hernández 2010).

Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados del género *Tilia*

Tejido vegetal	Compuesto
Flores	Quercetina- 3,7-diramnósido
	Isoquercitrina+ rutina
	quercitrina
	astragalina
	tilirósido
	kaenferol-3,7-diramnósido
	quercetina-3-pentosilhexósido
kaenferol-3.pentosilhexósido	
Brácteas	Hiperósido
	Quercetina-3,7-diramnósido
	Isoquercitrina+rutina
	Kaenferol-3,7-diramnósido
	Quercitrina
	Astrangalina
	Tilirósido
	quercetina-3-pentosilhexósido
	kaenferol-3.pentosilhexósido
rutina	
Hojas	Hiperósido
	Quercetina-3,7-diramnósido
	Isoquercitrina+rutina
	Kaenferol-3,7-diramnósido
	Quercitrina
	Astrangalina
Tilirósido	

Fuente: Toker, et. al., 2001 y 2004, Aguirre-Hernández et al., 2010

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la poca información que existe acerca del género *Tilia* en México, actualmente se está realizando una investigación a fondo considerando aspectos como distribución, condiciones climáticas, identificación de metabolitos secundarios, actividad farmacológica, morfología y anatomía. Razón por la cual en este trabajo de apoyo a la investigación se dio seguimiento al estudio fitoquímico y farmacológico comparativo de tilias colectadas en Morelos y Puebla.

4. OBJETIVOS

1 Realizar una comparación por CCF de la presencia de terpenoides y flavonoides de

tilias colectadas en Morelos y Puebla.

2 Demostrar el efecto depresor de los extractos en el SNC

3 Evaluar el efecto ansiolítico de los extractos orgánicos mediante tres modelos experimentales (tablero con orificios, levantamientos, cilindro y cruz elevada)

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño experimental

En la figura 1 se ilustra el diseño experimental que se siguió para lograr los objetivos planteados

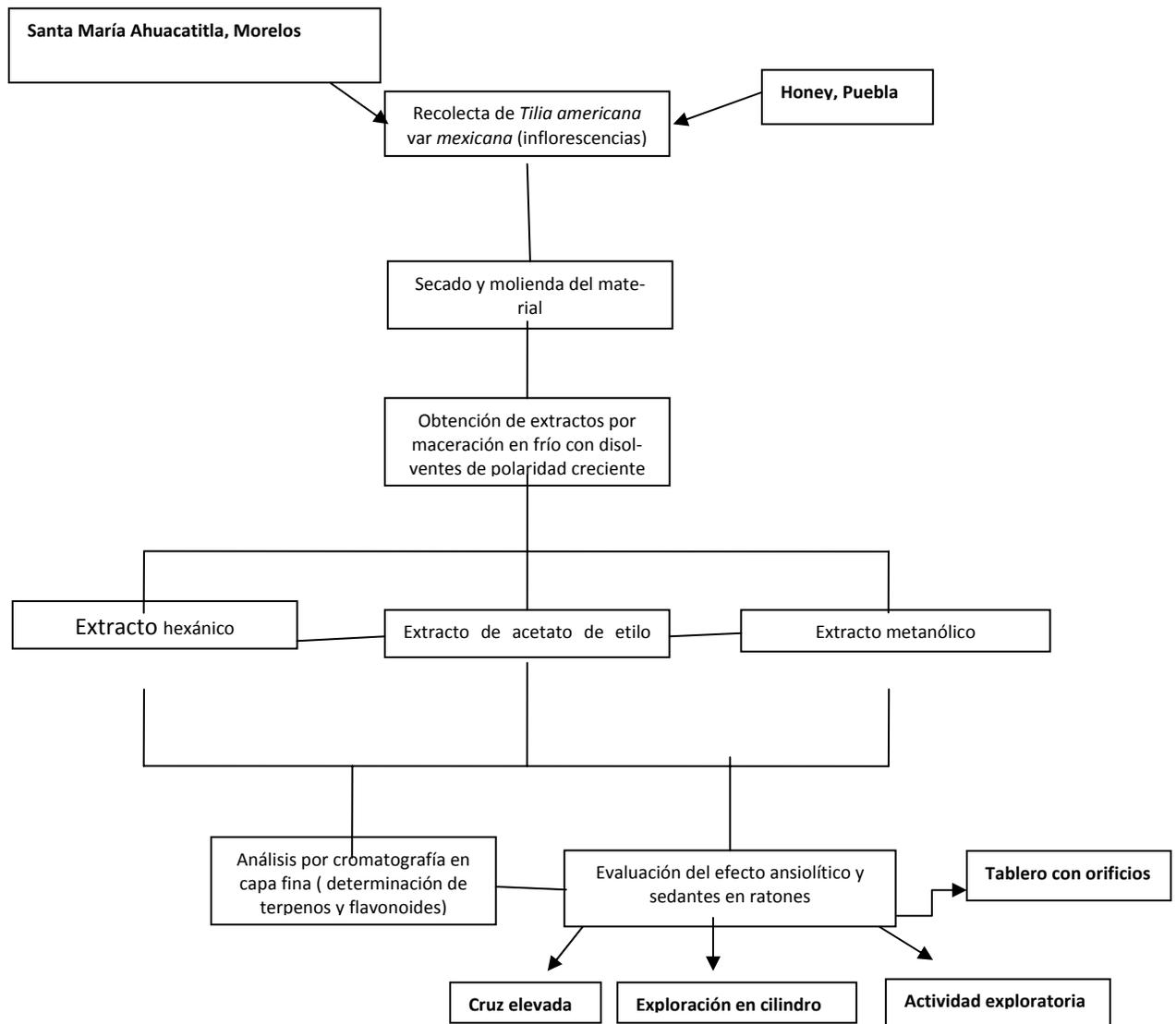


Figura 1 Diseño experimental

4.2. Sitios de colecta de material vegetal

Los sitios de colecta que se estudiaron fueron seleccionados debido a la cercanía con la Ciudad de México, es decir, los estados de Puebla y Morelos.

Además de que los sitios de colecta fueron en los meses de julio debido a que es la época de floración para la planta.

La colecta de tilia en el estado de Morelos se hizo en Santa María Ahuacatlán cerca de Cuernavaca, Mor. El sitio se localiza aproximadamente a los 18°52' norte y 99°15'W, a una latitud a 1,650 m. La vegetación es natural de bosque mesófilo de montaña.

La tilia en el estado de Puebla se colectó a 5 km de la cabecera Municipal de Honey, Puebla. El sitio se localiza aproximadamente en los paralelos 20°12'32" y 20°18'48" latitud norte y los meridianos 98°11'18" y 98°17'42" longitud occidental, a una latitud entre los 1,300 y 2,300m. Los suelos predominantes son sílice, arcilla, alumbre y pizarra. La temperatura media anual oscila entre los 12 y 16°C y las más fría -3 y 18°C. Se presentan cuatro tipos de climas, semifrío húmedo, templado húmedo, templado húmedo con lluvias todo el año y templado subhúmedo. La vegetación natural está constituida por bosques de pino, mesófilo de montaña y asociación de pino-encino que cubren de manera dispersa el 50% del territorio.

4.3. Obtención de extractos

Una vez realizado el secado y molienda del material, éste se sometió a cuatro extracciones sucesivas con diferentes disolventes de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo y metanol). El disolvente se eliminó mediante un rotavapor (Büchi R250), para la obtención de los extractos secos. Posteriormente se determinó el porcentaje de rendimiento para cada extracto.

5.2. Presencia de terpenoides y flavonoides de *T. americana* var . *mexicana* de dos sitios de recolecta por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

4.4. Análisis de los extractos por Cromatografía en Capa Fina

En la literatura acerca de la composición química de las especies del género *Tilia*, se menciona que se han aislado e identificado compuestos hidrocarburos, terpenoides y flavonoides (quercitrina, kaenferol, l-hiperóxido, l-isoquercitrósido y astragalósido) (Matsuda et al., 2002; Aguirre-Hernández et al., 2007a, 2007b y 2010). Por lo cual, en este trabajo, se realizó un análisis por CCF de los extractos orgánicos de *T. americana* var. *mexicana* de dos sitios de colecta para evidenciar la presencia de terpenoides y flavonoides presentes en los extractos y determinar la diferencia o similitud entre ellos (Fig. 2).

Se utilizaron placas de sílica gel (Merck) de 10 x 3.3 cm, 10 x 5cm y 10 x 6 cm y 0.1 mm de espesor. Se prepararon soluciones a una concentración de 5 mg/ml de cada uno de los extractos y 1 mg/ml de los estándares (β -sitosterol, kaempherol, quercetina y rutina). Se aplicaron 10 μ l de cada extracto y 5 μ l de los estándares sobre la placa cromatográfica mediante la utilización de un aplicador automático CAMAG TLC4 en bandas de 5 mm espaciadas por 3 mm. Las muestras de cada uno de los extractos y de los estándares se aplicaron en las placas y éstas se eluyeron en una cámara de vidrio con 10 ml de una mezcla de tolueno-acetato de tilo (9:1) para el extracto hexánico y (8:2) para acetato de etilo y acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (12:1:1:0.5) para acetato y la concentración (12:1:1:1.5) para metanol. Las placas fueron reveladas con el Reactivo de Anisal-dehído para detección de terpenoides y el Reactivo de Productos Naturales/Polietilenglicol (NP/PEG) para detección de flavonoides. Posteriormente las placas se observaron con una lámpara de luz UV (onda larga 365 nm) y fueron fotografiadas después del revelado.

4.5. Determinación de la actividad ansiolítica

4.5.1. Animales utilizados en los modelos experimentales

Se utilizaron machos de la cepa cd1 con un peso de 25-30 g, proporcionados por la Unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Los sujetos experimentales se colocaron en cajas de acrílico en grupos de al menos cinco, sin restricción de alimento, ni agua y mantenidos a una temperatura controlada de 22°C con ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Los animales se manejaron conforme a la Norma Oficial Mexicana para el manejo y cuidado de animales (NOM-062-ZOO-1999), aprobada por el Comité Institucional de Ética.

4.5.2. Preparación de los extractos y fármacos

Los extractos se resuspendieron con tween 80 al 0.5% en solución salina al 0.9%. El pentobarbital (Sedal Vet^R) se diluyó con solución salina 0.9%. Tanto los fármacos como los extractos se utilizaron de reciente elaboración. La prueba de potenciación de la hipnosis producida por el pentobarbital se usó para determinar el tiempo entre la administración de los extractos y la evaluación del efecto ansiolítico y/o sedante. En un tiempo de 60 min después de la administración del extracto. Las dosis de extracto a evaluar fueron 100 mg/kg y se administraron por vía intraperitoneal (i.p.).

4.5.3. Potenciación de la hipnosis inducida por pentobarbital sódico El modelo del pentobarbital es utilizado para conocer si los fármacos de prueba poseen alguna actividad sobre el sistema nervioso central al potenciar su efecto.

El pentobarbital sódico es un barbitúrico que dependiendo de la dosis es utilizado como tranquilizante, sedante e hipnótico. Su tiempo de acción es de aproximadamente 60-90 seg. Este fármaco se administró a los ratones a una dosis de 42 mg/kg para observar un efecto hipnótico.

En este trabajo, se administró a los ratones la dosis de 100 mg/kg de los extractos a los ratones. Una hora después recibieron una dosis de PS para enseguida registrar la duración de la hipnosis (González-Trujano et al., 1998).

4.5.4. Evaluación de la actividad exploratoria

La prueba consiste en colocar individualmente a los ratones en una caja de acrílico con 12 divisiones (cuadrados de 6 x 6 cm) y registrar durante 2 minutos el número de cuadros explorados por cada ratón. Se mide la disminución en la actividad exploratoria nos indica un efecto sedativo con respecto al control.

4.5.5. Efecto ansiolítico y/o sedante

Se menciona en la literatura el uso de varios modelos animales para evaluar la actividad ansiolítica de nuevos productos. Dichos modelos están basados en efectos sobre una reacción animal simple o incondicionada que explotan conductas determinadas genéticamente, otros se basan en el aprendizaje

En esta investigación los modelos experimentales utilizados fueron los de efecto de conducta exploratoria por ser simples, económicos, repetitivos, rápidos y homólogos en cuanto a la conducta con el ser humano y son:

1) El modelo de cruz elevada (pluz-maze)



Este aparato esta hecho de madera y consta de una cruz elevada con dos brazos abiertos 30 x 5 cm y dos brazos cerrados de 30 x 5 x 15 cm. Dichos brazos se extienden a partir de una plataforma central de 5 x 5 y se encuentran elevados a 50 cm del suelo. Los ratones son colocados en la parte central y se cuenta el número de entradas y el tiempo que los animales permanecen en los brazos abiertos ó cerrados durante 5 minutos. El aumento de exploración en los brazos abiertos con respecto al control, es indicativo del efecto ansiolítico (Lister, 1987).

2) El modelo del tablero con orificios (*hole board*)



Este modelo consiste de una caja de acrílico con un piso de madera con orificios distribuidos uniformemente. Los ratones son colocados sobre el tablero y se cuenta el número de veces que los animales introducen su cabeza en los orificios en un periodo de 3 min. Una disminución en el número de exploraciones con respecto al control será indicativa de efectos sedantes y/o ansiolíticos (Clark et al., 1997).

3) El modelo de exploración en cilindro



En esta prueba el ratón es colocado dentro de un cilindro de vidrio (20 cm de altura x 13 cm de diámetro x 5 mm de grosor) y se cuenta el número de veces que el animal se para sobre sus patas traseras apoyando sus extremidades anteriores en la pared del cilindro durante 5 min. Una disminución en el número de levantamientos con respecto al control indica un efecto sedante y/o ansiolítico (Hiller y Zetler, 1996).

4. Evaluación de la actividad exploratoria



La prueba consiste en colocar individualmente a los ratones en una caja de acrílico con 12 divisiones (cuadrados de 6 x 6 cm) y registrar durante 2 minutos el número de cuadros explorados por cada ratón.

4.5.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se hizo mediante análisis de varianza (ANADEVA) seguido de la prueba t de Dunnett, y Tukey, en la comparación de los tratamientos contra el control. Se utilizó el programa Sigma Stat versión 5.3.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANÁLISIS FITOQUÍMICO

5.1. Rendimiento de los extractos

El rendimiento de los extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos de las inflorescencias fue calculado a partir de la muestra original a extraer considerando esta como el 100%. Los datos muestran en el Cuadro 4 que los extractos metanólicos de ambos ejemplares fueron los que tuvieron mayor rendimiento y los extractos de acetato de etilo los de menor.

El mayor rendimiento del extracto metanólico es debido entre otros factores a la presencia de glicósidos y compuestos

Cuadro 4. Rendimiento de los extractos obtenidos de las inflorescencias de *Tilia americana* var. *mexicana*.

INFLORESCENCIAS (peso seco)	EXTRACTOS					
	HEXANO		ACETATO DE ETILO		METANOL	
	PESO (g) De la mues- tra a ex- traer	(%)	PESO (g)	(%)	PESO (g)	(%)
<i>T. americana</i> var. <i>mexicana</i> Morelos 137.424g	3.5063	2.5	1.4789	1.06	16.5738	12.0
<i>T. americana</i> var. <i>mexicana</i> Puebla 149.469g	1.9737	1.31	1.6741	1.11	17.3053	11.5

ANALISIS CROMATOGRAFICO

5.2. Presencia de terpenoides de *T. americana* var. *mexicana* de dos sitios de recolecta por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Los resultados acerca del análisis cromatográfico evidencia la presencia de terpenoides para los dos extractos, hexánico y de acetato de etilo de las dos muestras estudiadas

En el cromatográfico perfil obtenido no se observan diferencias en cuanto al número de compuesto o compuestos, pero sí en la intensidad de este o estos. Con respecto a la presencia de β -sitosterol, el triterpeno aislado e identificado en el género *Tilia* en México (Aguirre-Hernández 2007b) se encuentra presente en los extractos hexánicos y de acetato de etilo, pero en mayor intensidad en el extracto hexánico de el ejemplar de *Tilia* colecta en el estado de Puebla.

Estos resultados sugieren una influencia ambiental por la presencia de compuestos de tipo terpenoide así como en la presencia de β -sitosterol.

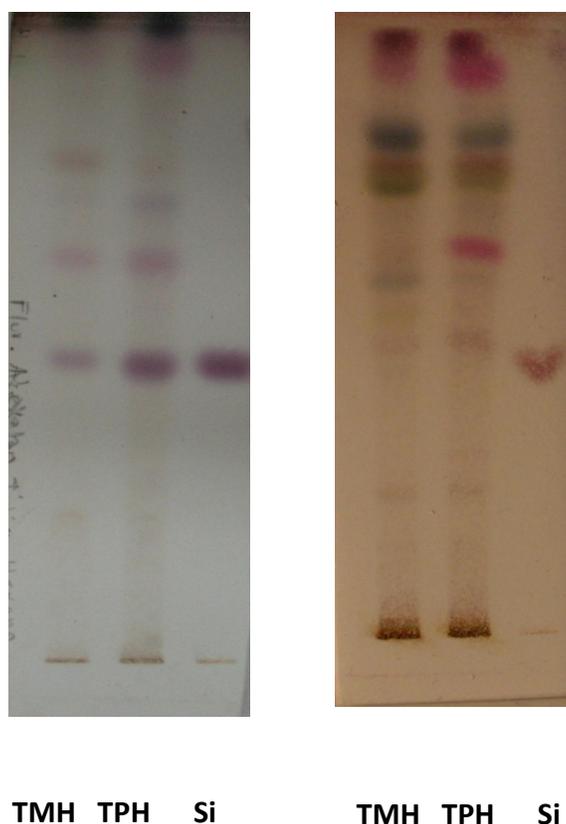


Figura 2. Presencia de terpenoides de los extractos hexánicos y de acetato de etilo de *T. americana* var. *mexicana* de Morelos y Puebla. Tilia Morelos hexano (TMH), Tilia Puebla hexano (TPH), Tilia Morelos acetato de etilo (TMA), Tilia Puebla acetato de etilo (TPA), β -sitosterol (Si).

5.3. Presencia de flavonoides de *T. americana* var . *mexicana* de dos sitios de recolecta por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Los resultados obtenidos del perfil demuestran la presencia de flavonoides (Fig. 3) tanto en el extracto de acetato de etilo como en el metanólico y también se observan diferencias en la concentración de los mismos, en cada uno de los ejemplares de los dos sitios de colecta. La rutina, un glicósido de la quercetina, está presente en los extractos metanólicos de ambas placas de ambos sitios, pero se encuentra en mayor intensidad en los ejemplares de la recolectada en Morelos.

La concentración de los compuestos detectados podrá estar en función del sitio de recolecta así como de la edad de la planta por lo que surge la necesidad de estudios para cuantificar los componentes en cada uno de los extractos.





Figura 3. Presencia de flavonoides de los extractos de acetato de etilo y metanólicos de *T. americana* var. *mexicana* de Morelos y Puebla. Tilia Morelos acetato de etilo (TMA), Tilia Puebla acetato de etilo (TPA), Tilia Morelos metanol (TMM), Tilia Puebla metanol (TPM), kaenferol (K), quercetina (Q), rutina (R)

5.3. Presencia de flavonoides de *T. americana* var. *mexicana* de dos sitios de recolecta por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Los resultados obtenidos del perfil demuestran la presencia de flavonoides (Fig. 3) tanto en el extracto de acetato de etilo como en el metanólico y también se observan diferencias en la concentración de los mismos, en cada uno de los ejemplares de los dos sitios de colecta. La rutina, un glicósido de la quercetina, está presente en los extractos metanólicos de ambas placas de ambos sitios, pero se encuentra en mayor intensidad en los ejemplares de la recolectada en Morelos.

EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

5.3. Potenciación de la hipnosis inducida por pentobarbital sódico (PS)

En la evaluación del efecto sedante-hipnótico por medio de la prueba de PS de las tilias de los dos sitios de colecta se obtuvieron resultados similares. Como se pue-

de observar en la (figura 4) el extracto hexánico, de acetato de etilo y metanólico de las inflorescencias de *Tilia americana* var. *americana* de ambos sitios de colecta a una dosis de 100mg/kg por vía i.p. produjeron una potenciación en la duración de la hipnosis inducida por PS.

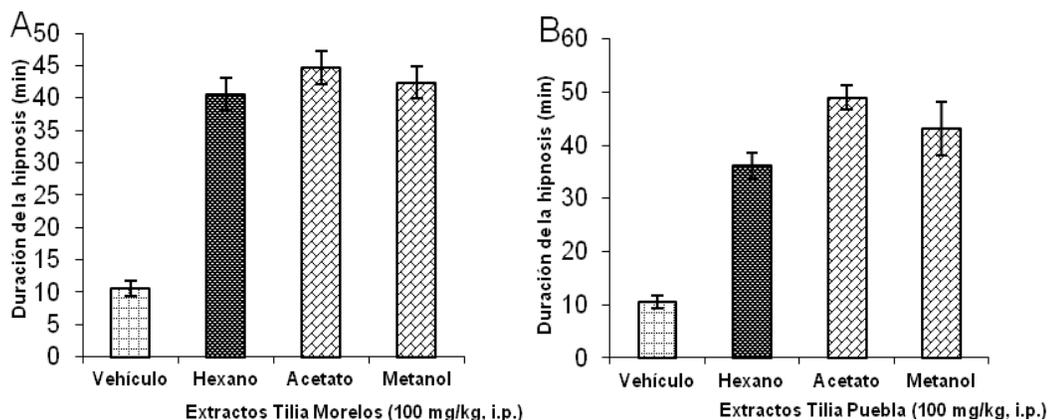


Figura 4. Evaluación de la duración de la hipnosis de los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico de inflorescencias de *T. americana* var. *mexicana* en combinación con pentobarbital sódico (42 mg/kg, i.p.). Las barras representan el promedio \pm E.E.M. de cinco animales * $p < 0.05$ ANADEV A seguida de la prueba t de Dunnett vs. vehículo.

5.4. Efecto ansiolítico y actividad exploratoria de los tres extractos de la tila colectada en Morelos administrados por vía i.p.

En la prueba de ansiedad (Fig. 5 A), solamente el extracto metanólico produjo un incremento significativo en la exploración en brazos abiertos y por lo tanto un efecto ansiolítico. En los dos modelos siguientes, los tres extractos redujeron el número de levantamientos (Fig. 5 B), y el número de exploraciones con respecto al control (Fig. 5 C). También observamos una disminución significativa de la actividad ambulatoria en el modelo de transiciones en los ratones (Fig.5 D).

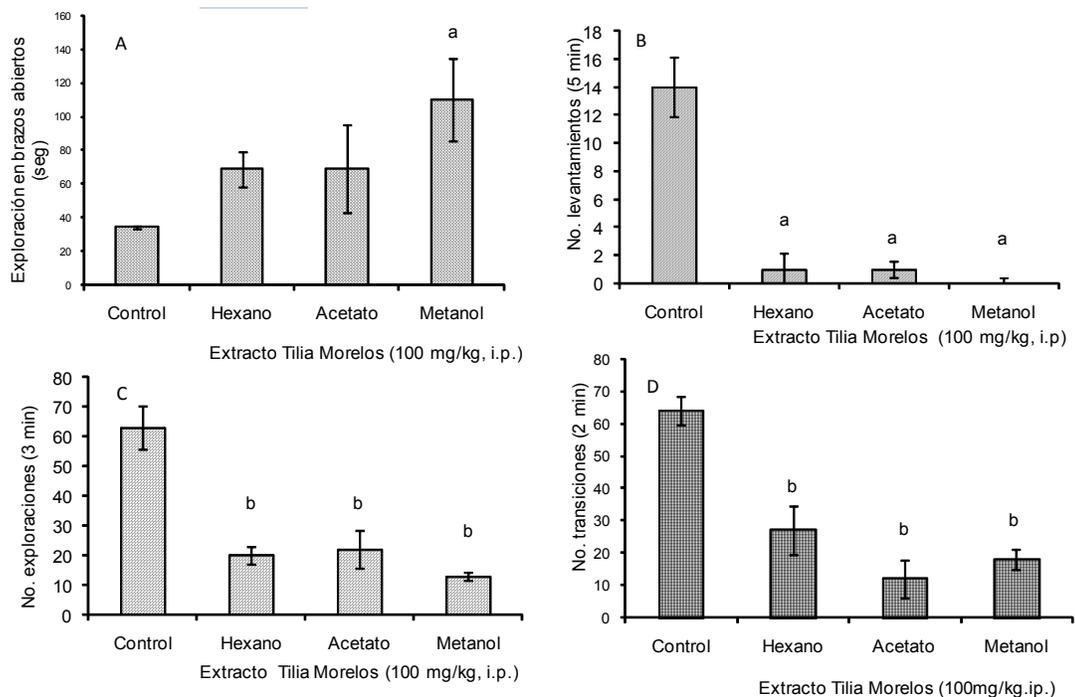


Figura 5 Evaluación del efecto ansiolítico y de la actividad exploratoria de los tres extractos de inflorescencias de *T. americana* var. *mexicana* colectada en Morelos. Modelo de cruz elevada (A), exploración en cilindro (B), tablero con orificios (C) y actividad exploratoria (D). Las barras representan el promedio \pm E.E.M. de cinco animales. $p < 0.05$, ANADEVa seguida de la prueba t de Dunnett (a) y Tukey (b).

5.5. Efecto ansiolítico y actividad exploratoria de los tres extractos de Puebla administrados por vía i.p.

En la Fig. 6 A se observa que el extracto hexánico produjo un incremento significativo en la exploración en brazos abiertos. En el modelo de levantamientos (Fig. 6 B), los tres extractos redujeron el número de paradas en la dosis evaluada y en el modelo de tablero con orificios (Fig. 6 C) se redujo el número de exploraciones. Además la actividad exploratoria disminuyó significativamente.

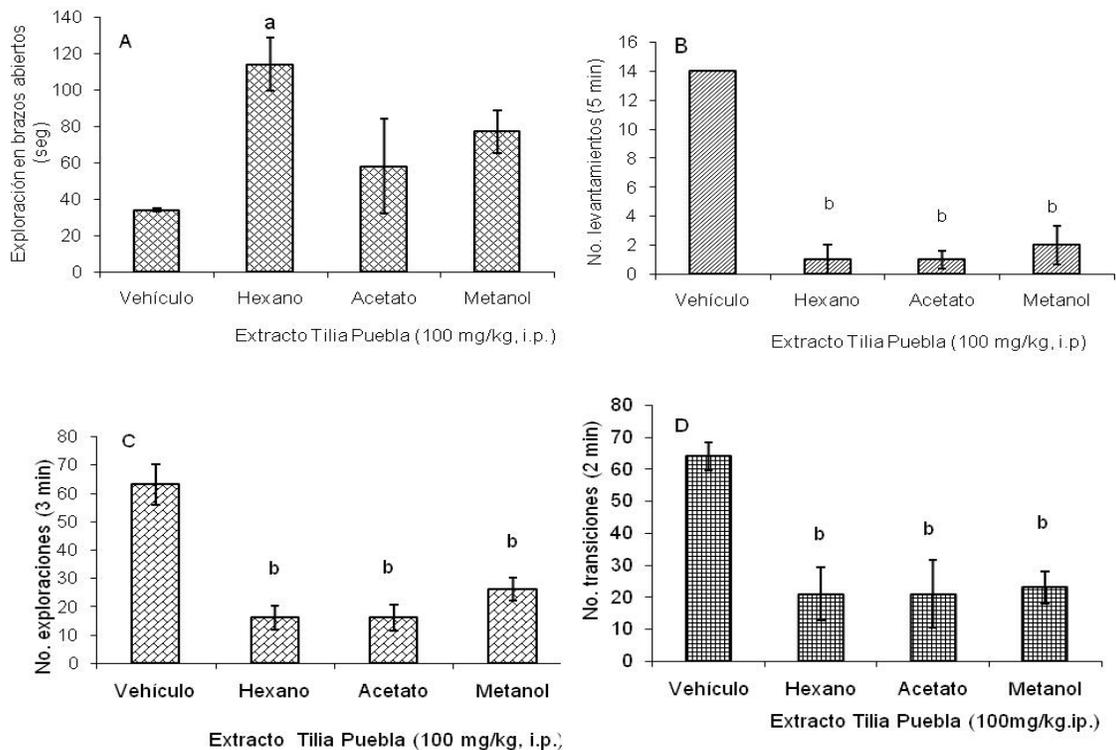


Figura 6 Evaluación del efecto ansiolítico y de la actividad exploratoria de los tres extractos de inflorescencias de *T. americana* var. *mexicana* colectada en Puebla. Modelo de cruz elevada (A), exploración en cilindro (B), tablero con orificios (C) y actividad exploratoria (D). Las barras representan el promedio \pm E.E.M. de cinco animales. $p < 0.05$, ANADEVa seguida de la prueba t de Dunnett (a) y Tukey (b) contra vehículo

La presencia de β -sitosterol en los extractos hexánicos y de acetato de etilo se encuentra en mayor concentración en el extracto hexánico de el genero *Tilia* recolectada en el estado de Puebla y esto concuerda con la actividad ansiolítica significativa observada en el modelo de cruz elevada. Estos resultados permiten sugerir que el efecto ansiolítico del extracto hexánico está relacionado con la presencia y concentración del β -sistosterol. Esto concuerda con lo ya reportado en la literatura (Aguirre-Hernández et al., 2007b).

El análisis de las figuras de los modelos de ansiedad para brazos abiertos indican que solamente el extracto metanólico de la tilia colectada en Morelos tuvo un efecto significativo con respecto al control y precisamente es en esta tilia donde la rutina se encuentra en mayor concentración. De acuerdo a lo reportado por Aguirre-Hernández et al., 2010, el extracto metanólico de *T. americana* var. *mexicana* es una mezcla de flavonoides glicosilados de kaenferol y quercetina y al parecer, estos compuestos participan en el efecto ansiolítico y sedante de esta especie. Dichos efectos podrían ser atribuidos a la afinidad que presentan algunos compuestos de este tipo con el complejo receptor GABA/Benzodiazepinas (Viola et al., 1994; Haberlein et al., 1994; Wolfman et al., 1998).

Los resultados de los perfiles cromatográficos muestran que si hay diferencias en cuanto a la concentración de flavonoides y terpenoides de acuerdo al sitio de colecta. Esto se debe a que factores ambientales como la temperatura, la luz, el agua, la altitud, el suelo, etc., influyen en la síntesis de los mismos (Min Chunga, et al., 2006).

6. CONCLUSIONES

Los resultados farmacológicos corroboran el efecto sedante y ansiolítico que se le atribuye a *T. americana* var. *mexicana* en la medicina tradicional mexicana

Los resultados obtenidos del perfil cromatográfico indican que la concentración de los metabolitos secundarios varía dependiendo del lugar de procedencia del material vegetal, lo cual influye en la actividad farmacológica.

Se corrobora la presencia de flavonoides y terpenoides en el género *Tilia*.

7. REFERENCIAS

Aguilar, A. J. C., Camacho, S. Chino. P. Jácquez y M. E. López. 1994. Herbolario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. Instituto Mexicano del Seguro Social. México. pp. 253. Aguirre-Hernández, A.L. Martínez, M.E. González-Trujano, J. Moreno, H. Vibran, M. Soto-Hernández. 2007. Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. *mexicana* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 109, 140-145.

Aguirre-Hernández, E. H. Rosas-Acevedo, M. Soto-Hernández, J. Moreno, M.E. González-Trujano. 2007. Bioactivity-guided isolation of β -sitosterol and some fatty acids as active compounds in the anxiolytic and sedative effects of *Tilia Americana* var. *Mexicana*. *Planta Medica* 73:1148-1155

Aguirre-Hernández, E. Ma. Eva González-Trujano, Ana Laura Martínez, Julia Moreno, Geoffrey Kite, Teresa Terrazas, Marcos Soto-Hernández. 2010. TLCHPLCMS analysis and anxiolytic-like effect of quercetin and kaemferol flavonoids from *Tilia americana* var. *mexicana*. *Journal of Ethnopharmacology* 127:91-97.

Argueta, A.(comp.). 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana Tomo II. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. México. pp.1337.

Arias-Carrión y R. Drucker-Colín. 2007. Neurogénesis como estrategia terapéutica para regenerar el sistema nervioso central. *Revista de Neurología* 45(12):739-745.

Balandrin, M.F., A.D. Kinghorn y N.R. Farnsworth, 1993. Plant-derived natural products in drug development. *Journal American Chemical Society* 101:3-12.

Brailowsky, S. 1998. Las sustancias de los sueños. *Neuropsicofarmacología*. Segunda edición. Fondo de Cultura Económica, México, D.F; 355 pp.

- Buchbauer, G., B. Remberg., L. Jirovetz y A. Nikiforov. 1995. Comparative head-space analysis of living and fresh cut lie tree flowers (*Tiliae flores*). *Flavour and Fragrance Journal* 10:221-224
- Bush, B.F. 1929. The Mexican species of *Tilia*. *The American Midland Naturalist* 11:543-560.
- Clark, G., A.G. Koster y D.W. Person. 1997. Exploratory behaviour in chronic disulfoton poisoning in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 20:169-171.
- Cedric, M., M.D. Smith, M Alan y D. Renard. 1997 *Farmacología*. Editorial Médica Panamericana, México, D :F : 1135 pp.
- Corsi. C .M. 1996. *Aproximaciones de neurociencias a la conducta*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 393.
- Cronquist, A. 1988. *The evolution and classification of flowerin plants*. Second Edition. The New York Botanical Garden, New York.555 pp
- Duke, J., Bogenschutz-Godwin, M., du Cellier, J. y Duke, P. 2002. *Handbook of Medicinal Herbs*. Second Edition. CRC Press. Estados Unidos. p.870.
- Drucker, C. 2005. *Fisiología médica*. Editorial El Manual Moderno, México, D:F: 938 pp.
- Estrada, E. 1985. *Jardín Botánico de Plantas Medicinales Maximino Martínez (1888-1964)*. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma de Chapingo. México. p. 40.
- Echeburúa, E. 1995. *Evaluación y tratamiento de la fobia social*. Editorial Martínez Roca, México, D:F:
- González-Trujano, M.E., Navarrete, C.A., Reyes, B., Hong, E. 1998. Some pharmacological effects of etanol extract of leaves of *Annona diversifolia* on the central nervous system in mice. *Phytotherapy Research* 2: 600-602.

Haberlein, H., K.P. Tschiersch y H.L. Schafer. 1994. Flavonoid from *Leptospermum scoparium* with affinity to the benzodiazepine receptor characterized by structure activity relationships and in vivo studies of a plant extract. *Pharmazie* 49:912-921.

Hardin J.W. 1990. Variation patterns and recognition of varieties of *Tilia americana* s.l. *Systematic Botany* 15:33-48.

Hiller, K. G. Zetler. Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis*: behavioral and anticonvulsant properties. *Phytotherapy Research* 10:145-151.

Jones, G:N: 1968. Taxonomy of American species of Linden (*Tilia*). *Illionois Biological Monographs* 39:1-156.

Martínez, M. 1969. Las plantas medicinales de México. Editorial Botas, México, D.F. pp. 329-330.

Matsuda, H., Ninomiya, K., Simoda, H., Yoshikawa, M. (2002) Hepatoprotective principles from the flowers of *Tilia argentea* (Linden): structure requirement Otili-roside and mechanism of action. *Bioorganic and Medicinal chemistry* 10:707-712.

Min Chunga, Jong Jin Kimb, Jung Dae Limc, Chang Yeon Yuc, Seung Hyun Kimd y Sang Joon Hahna. 2006. Comparison of resveratrol, SOD activity, phenolic compounds and free amino acids in *Rehmannia glutinosa* under temperature and water stress. *Environmental and Experimental Botany* 56: 44-53.

Neal, M:J: 1992. Central transmitter substances. Pp. 48-53. En: University Press, Cambridge (ed.) *Medical Pharmacology at a Glance*. Blackweell Science, Australia.

Pérez de la Mora, M. 2003 Dónde y cómo se produce la ansiedad: sus bases biológicas. *Ciencia* 54:16-28.

Pietta, P., P Mauri, A. Bruno y L. Zini. 1993. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry of flavonoid glycosides from *Tilia*. Journal of Chromatography 638:357-361.

Rodríguez-Landa, J:F: y C:M: Contreras. 1998. Algunos datos recientes sobre la fisiopatología de los trastornos por ansiedad Revista Biomédica 9:181-191.

Schultz, V., Hänsel, R. y Tyler V: E: 2001. Rational Phytotherapy. A physicians guide to herbal medicine, Springer. Alemania. p. 383.

Tang ya y Zhuge Ren. 1996. Geographical distribution of *Tilia* L. Acta Phytotaxonomica Sinica 34 :254-264.

Tortora, G.J. y S. R. Grabowski. 1999. Principios de anatomía y fisiología. Séptima edición. Harcount Brace, Madrid España. 999 pp.

Toker, G., M. Aslan, M., Yesilada, M., Memisoglu, M., Ito, S. 2001. Comparative evaluation of the flavonoid content in officinal *Tiliae flos* and Turkish lime species for quality assessment. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 26:111-121.

Tzakou, O. H., Skaltsa y S. Philianos. 1987. Sur les constituents polyphénoliques des sommités fleuries de *Tilia tomentosa* Moench. Plantes Medicinales et Phytothérapie 21: 305-310.

Viola , H., C. Wolfman, M. Levi de Stein. C. Wasowwski, C. Peña J:H: Medina y A: C: Paladini. 1994. Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tomentosa* (Tiliaceae) Journal of Ethnopharmacology 44: 47-53.

Wong, A.H., M. Smith y H.S. Boon.1998. Herbal remedies in psychiatric practice. Archgen Psychiatri 55:1033-1041.

Wolfman, C., H. Viola, M. Marder, P. Ardenghi, C. Wasowski, N. Schroder, I. Izquierdo, E. Rúvedas, A. Paladín y J.H. Medina. 1998. Pharmacological characterization of 6-bromo-3-nitroflavone, a synthetic flavonoid with high affinity for the benzodiazepine receptors. Pharmacology Biochemistry and Behavior 61:239-246.

Tresguerras, J:A:F: 1992. Fisiología humana. Interamericana. México, D.F. 1216 pp.