



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**Estudio farmacológico y químico de la Flor de Tila:  
*Ternstroemia pringlei* y *Ternstroemia sylvatica***

TESIS  
PARA OBTAR POR EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:  
**M. EN C. JOSÉ LUIS BALDERAS LÓPEZ**

TUTOR:  
**DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO**  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM



SEPTIEMBRE 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo fue realizado en el  
Laboratorio 126 de la Facultad de Química, UNAM



Bajo la dirección del Dr. Andrés Navarrete Castro

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Andrés Navarrete Castro por su apoyo, asesoramiento, amistad y por permitirme pertenecer a su grupo de trabajo.

A:

### **Facultad de Química, UNAM**

Dr. Rogelio Pereda Miranda  
Dr. Fausto Rivero Cruz  
Dra. Mabel Fragoso  
M. en C. Alejandro Alfaro Romero

### **USAI, Facultad de Química, UNAM**

Dra. Georgina Duarte Lisci, EM  
Dra. Nuria Esturau Escofet, RMN

### **Sinodales**

Dr. Manuel Jiménez Estrada  
Dra. Rachel Mata Essayag  
Dr. Samuel Enoch Estrada  
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes  
Dr. Ricardo Reyes Chilpa

### **FES Iztacala, UNAM**

Biol. Edith López Villafranco

### **Universidad Autónoma de Sinaloa**

QFB Amor Monroy Villagrana

### **Herbario IMSS**

Dra. Abigail Aguilar

### **FES Zaragoza, UNAM**

QFB Rosalba Cervantes

### **Comité Tutorial**

Dra. Ma. Eva González Trujano  
Dr. Ricardo Reyes Chilpa

por sus valiosas contribuciones en la realización de este trabajo.

## FINANCIAMIENTO

### **CONACyT**

Beca con número de registro 116413

### **PAIP**

Proyecto 4390-18

### **DGAPA**

Proyecto IN210112

## CONGRESOS

Los resultados del presente trabajo fueron presentados en los siguientes congresos:

**XXXI Congreso Nacional de Farmacología** con el trabajo:

**Balderas-López JL**, Alfaro-Romero A, Monroy A y Navarrete A. *Perfil neurofarmacológico de los extractos metanólico y acuosos de Ternstroemia pringlei y Ternstroemia sylvatica*, realizado del 28 al 30 de abril de 2008 en México, DF.

**XXXII Congreso Nacional de Farmacología** con el trabajo:

**Balderas-López JL**, Alfaro-Romero A, Monroy A y Navarrete A. *Efecto tóxico más que efecto sobre el SNC de los extractos acuosos y metanólicos de las Tilas mexicanas (Ternstroemia pringlei y Ternstroemia sylvatica) en rata*, realizado del 14 al 17 de junio de 2009 en Oaxtepec, Morelos.

**11th Annual Oxford International Conference on the Science of Botanicals**, con el trabajo:

**Balderas-López JL**, Alfaro-Romero A, Monroy A, López-Villafranco ME, Rivero-Cruz JF y Navarrete A. Identification of 28-O-[ $\beta$ -L-6-rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol from *Ternstroemia sylvatica* Schltdl. & Cham. (Theaceae) as a new compound with toxic effects in rodents. Realizado del 16 al 19 de abril del 2012 en Oxford, MS, EUA.

**48° Congreso Mexicano de Química**, con el trabajo:

**José Luis Balderas-López**, Alejandro Alfaro-Romero, José Fausto Rivero, Andrés Navarrete Castro. Efecto tóxico más que efecto neurofarmacológico de *Ternstroemia sylvatica* e identificación del triterpeno 28-o-[ $\beta$ -L-6-ramnopiranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol como un nuevo compuesto con efectos tóxicos en ratón. Realizado del 31 de agosto al 4 de septiembre del 2013 en Guanajuato, Gto., México.

## PUBLICACIONES

Los resultados del presente trabajo fueron publicados en:

**Balderas J**, Reza V, Ugalde M, Guzmán L, Serrano M, Aguilar A y Navarrete A. 2008. Pharmacodynamic interaction of the sedative effects of *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standl. with six central nervous system depressant drugs in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 119:47–52.

Guzmán-Gutiérrez S L, **Balderas J L**, Aguilar A y Navarrete Andrés. 2009. Sedative activity of some plants used in México to treat insomnia. *Revista Latinoamericana de Química*, 37(3): 243-251.

**Balderas-López J**, Alfaro-Romero A, Monroy A, López-Villafranco M, Rivero-Cruz J y Navarrete A. 2013. Toxic rather than neuropharmacological effect of *Ternstroemia sylvatica* fruits and identification of 28-O-[ $\beta$ -L-6-rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol as a new compound with toxic effects in mice. *Pharmaceutical Biology* (en prensa), DOI 10.3109/13880209.2013.799706

Con todo mi amor y cariño a mis  
dos agonistas esenciales de mi vida:  
mi esposa **Blanca Rosa** y mi hija **Mary Lou**  
por su apoyo incondicional en  
los momentos más difíciles ...

## TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	1
NOTACIONES EMPLEADAS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
MARCO TEÓRICO	7
1. Plantas con actividad en el Sistema Nervioso Central	7
1.1 Clasificación de las plantas por su acción en el SNC	8
1.2 Plantas con actividad neurofarmacológica documentada	9
2. Familia <i>Ternstroemiaceae</i>	10
2.1 Género <i>Ternstroemia</i> Mutis ex L.F.	10
2.2 Flor de Tila	12
2.2.1 <i>Ternstroemia pringlei</i> (Rose) Standley	12
2.2.2 <i>Ternstroemia sylvatica</i> Schl. & Cham.	13
3. Estudios realizados a plantas del género <i>Ternstroemia</i>	15
3.1 Estudios fitoquímicos	15
3.2 Estudios farmacológicos	17
3.2.1 Estudios farmacológicos realizados a <i>T. pringlei</i> y <i>T. sylvatica</i> .	24
4. Sedación	25
4.1 Medición de la actividad sedante	25
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	21
PARTE EXPERIMENTAL	22
Animales	22
Colecta del material vegetal	22
Preparación de los extractos	23
a) <i>Ternstroemia pringlei</i>	23
b) <i>Ternstroemia sylvatica</i>	24
Fármacos y sustancias	25
Pruebas farmacológicas	25
a) Cilindro de exploración ( <i>Exploratory Cylinder Test</i> )	25
b) Toxicidad aguda (DL <sub>50</sub> )	26



c) Prueba de campo abierto ( <i>Open Field Test</i> )	26
d) Inhibición de las convulsiones producidas por pentilentetrazol	27
e) Prueba del tablero de hoyos ( <i>Hole Board Test</i> )	27
f) Hipnosis inducida por pentobarbital	27
g) Efecto sobre la coordinación motora, prueba de Rota-rod	28
h) Prueba de miorelajación ( <i>Grip Strenght Test</i> )	28
Efecto en los parámetros farmacológicos	29
Análisis estadístico	29
Estudio químico	30
a) Ácido 3- $\alpha$ -epi-ursólico (I)	30
b) 28-O-[ $\beta$ -L-6-ramnopiranosil]-R <sub>1</sub> -barrigenol (II)	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
Preparación de los extractos	33
Parte farmacológica	34
Parte química	59
CONCLUSIONES	67
REFERENCIAS	68
ANEXO I. TABLAS DE RESULTADOS	74
ANEXO II. ESPECTROS	82
ANEXO III. ARTICULOS	95

## NOTACIONES EMPLEADAS

AcOEt	Acetato de etilo
ANOVA	Análisis de varianza
C	Grupo control
CCF	Cromatografía en capa fina
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CG/EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
COSY	Espectroscopia de correlación homonuclear hidrógeno-hidrógeno
DE <sub>50</sub>	Dosis efectiva media
DL <sub>50</sub>	Dosis letal media
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
ED <sub>50</sub>	Dosis efectiva media
eem	Error estándar de la media
EM(IE)	Espectrometría de masas por impacto electrónico
EM(FAB)	Espectrometría de masas por bombardeo rápido de átomos
H <sub>2</sub> O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HMBC	Espectroscopia de correlación múltiple heteronuclear carbono-hidrógeno
HSQC	Espectroscopia de correlación simple heteronuclear carbono-hidrógeno
i.p.	Intraperitoneal
IR	Espectroscopia de infrarrojo
IRR	Detector de índice de refracción
LD <sub>50</sub>	Dosis letal media
MeOH	Metanol
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sodio
NOESY	Espectroscopia de efecto nuclear aumentado
PLT	Número de plaquetas
PTZ	Pentilentetrazol
Py	Piridina
Py- <i>d</i> <sub>5</sub>	Piridina deuterada
Rha	Ramnosa
RMN <sup>13</sup> C	Espectrometría de resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Espectrometría de resonancia magnética nuclear protónica
SNC	Sistema Nervioso Central
<i>sp.</i>	Especie
<i>spp.</i>	Sin especie
<i>T</i>	Género <i>Ternstroemia</i>
TOCSY	Espectroscopia de correlación total hidrógeno-hidrógeno
UV	Luz ultravioleta

## RESUMEN

Los frutos de varias especies del género *Ternstroemia* son usados en la medicina tradicional mexicana para aliviar la ansiedad, desórdenes del sueño y convulsiones. *Ternstroemia sylvatica* y *Ternstroemia pringlei* son las especies más comunes del género *Ternstroemia* usadas en la medicina tradicional. Comúnmente se les denomina como “Flor de Tila”, ya sea en mezcla o por separado.

El objetivo de este trabajo fue investigar las propiedades neurofarmacológicas de los frutos de *T. pringlei* y *T. sylvatica* e identificar a sus principios activos. Los extractos crudos de *T. pringlei* mostraron efecto sedante, de los cuales el extracto acuoso fue el más activo ( $DE_{50} = 78.9 \pm 17.2$  mg/kg). Los extractos crudos de los frutos de *T. sylvatica*, separados en semillas y pericarpio, también mostraron efecto sedante, el extracto metanólico ( $DE_{50} = 13.81 \pm 1.74$  mg/kg) y el acuoso ( $DE_{50} = 4.93 \pm 0.77$  mg/kg) de las semillas los más activos. Los extractos metanólicos y acuosos de semillas de *T. sylvatica* también mostraron actividad anticonvulsivante, ansiolítica y miorrelajante, disminuyen la actividad motora y alteran la coordinación motora, mientras que los extractos de *T. pringlei* no presentaron actividad importante en estas pruebas.

Los extractos metanólicos y acuosos de ambos frutos también presentaron toxicidad, los extractos de *T. sylvatica* fueron los más tóxicos ( $DL_{50} = 3.77 \pm 2.55$  mg/kg para el metanólico y,  $4.96 \pm 1.44$  mg/kg para el acuoso). Además, el extracto acuoso de las semillas de *T. sylvatica* (10 - 100 mg/kg, i.p.) disminuye significativamente el número de plaquetas en ratas en una relación dependiente de la dosis y el tiempo. Los valores tan cercanos de  $DE_{50}$  y  $DL_{50}$  sugieren que el efecto de los frutos de *T. sylvatica* debe más a un efecto tóxico que a un efecto neurofarmacológico.

El nuevo producto natural, el 28-O- $[\beta$ -L-6-ramnospiranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol, se identificó como el principal componente de una mezcla de saponinas responsable de los efectos sedante y tóxico.

Con respecto a *T. pringlei* los resultados obtenidos difieren de los reportados al no comprobarse su actividad sedante y en su lugar, encontrar actividad tóxica.

## ABSTRACT

Fruits of several species from *Ternstroemia* genus are commonly used in the Mexican traditional medicine to alleviate anxiety, sleep disorders and seizures. *Ternstroemia sylvatica* and *Ternstroemia pringlei* are the most common *Ternstroemia* species used in folk medicine are commonly named as “Flor de Tila”.

The aim of this study was to investigate the neuropharmacological profile of *Ternstroemia sylvatica* and *T. pringlei* fruits and to identify their active components. Crude extracts of *Ternstroemia pringlei* showed sedative effect, being the aqueous extract the most active ( $ED_{50} = 78.9 \pm 17.2$  mg/kg). Crude extracts of *Ternstroemia sylvatica* fruits, separated in seed and pericarp, also showed sedative effect in mice, being the methanol ( $ED_{50} = 13.81 \pm 1.74$  mg/kg) and aqueous ( $ED_{50} = 4.93 \pm 0.77$  mg/kg) seed extracts the most active. Methanol and aqueous extracts also showed anticonvulsant, anxiolytic and myo-relaxant effect, decreased locomotor activity and disrupted motor coordination, whereas crude extracts of *T. pringlei* did not show significant activity.

Methanol and aqueous extracts from both fruits showed toxicity; the crude extracts of *T. sylvatica* were the most toxic ( $LD_{50} = 3.77 \pm 2.55$  mg/kg for aqueous extract and  $4.96 \pm 1.44$  mg/kg for methanol extract). In addition, aqueous extract from *T. sylvatica* seeds (10 - 100 mg/kg, i.p.) significantly decreased, in a dose- and time-dependent manner, the platelet count in rats. The close values of  $ED_{50}$  and  $LD_{50}$  suggest that *T. sylvatica* fruits effects are due more to a triterpene saponins that showed the sedative and toxic effect.

The results obtained of *T. pringlei* differed from the results reported in previous studies. We found toxicity instead of sedative activity.

## INTRODUCCIÓN

Varias especies vegetales del género *Ternstroemia*, denominadas comúnmente como **Flor de Tila** se utilizan ampliamente en la Medicina Tradicional Mexicana para el tratamiento de algunos desordenes del SNC como la excitación, trastornos del sueño como el insomnio, convulsiones y ansiedad. *Ternstroemia sylvatica* y *Ternstroemia pringlei* son dos de las especies más importantes de las denominadas como Flor de Tila.

En México, *Ternstroemia sylvatica* Schl. & Cham. y *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standley son utilizadas para disminuir la ansiedad y el insomnio. Sin embargo, algunos estudios han permitido establecer que *T. sylvatica* tiene efecto sedante en ratas (Molina *et al.*, 1999) y que *T. pringlei* produce efectos sedante y anticonvulsivante en estos roedores (Aguilar-Santamaría *et al.*, 1996). En ambos estudios no se describen las ventanas de actividad farmacológica ni las sustancias responsables de dichos efectos. Un estudio más reciente encontró que la jacaranona, una quinona, es una de las sustancias responsables del efecto sedante de *T. pringlei* (Lozada-Lechuga *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se estudiaron los efectos de los extractos de ambas especies en varios modelos experimentales que implican efecto sobre el Sistema Nervioso Central. Posteriormente, se realizó un estudio biodirigido con la finalidad de identificar los principios activos mediante un estudio biodirigido, con el objetivo de identificar las sustancias responsables de dichos efectos. Asimismo, se evaluó la toxicidad aguda en ratones y el efecto de los extractos sobre los valores de parámetros hematológicos en ratas. Este proceso condujo a la identificación del 28-O-[ $\beta$ -L-6-ramnopiranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol, como el principal componente de una mezcla de saponinas que muestra los efectos sedante y tóxico en las semillas de *T. sylvatica*.

## MARCO TEÓRICO

### 1. Plantas con actividad en el Sistema Nervioso Central

Las enfermedades y desórdenes del Sistema Nervioso Central (SNC) son algunas de las dolencias más comunes que afectan a la humanidad y se estima que el 32% de la población de Estados Unidos sufre de un desorden del SNC una vez en su vida, y el 15% de la población mayor de 18 años sufre de un desorden del SNC cada mes. En México, el 18% de la población urbana entre los 18 y 64 años sufre algún trastorno del SNC principalmente depresión y ansiedad. Los problemas de salud del SNC en la infancia no son identificados por lo que no se solicita atención al respecto, no obstante se calcula que un 70% de la población entre los 3 y los 12 años de edad se encuentra afectada (Clement *et al.*, 2004, Gómez *et al.*, 2011).

El uso de productos naturales para aliviar los desórdenes del SNC o para generar un estado mental alterado, probablemente se remonta a los albores del tiempo, cuando los primeros ensayos de acierto y error, realizados por los chamanes y otros humanos, permitió el descubrimiento de ciertas plantas con efectos en el SNC (Clement *et al.*, 2004).

La búsqueda de nuevas moléculas que actúan en el SNC y que pueden ser usadas con fines terapéuticos comienza con varios estudios en el siglo XIX. De hecho, los primeros remedios usados en el tratamiento de condiciones patológicas del SNC se basaban en fuentes naturales, especialmente plantas (Gomes, 2009).

## 1.1 Clasificación de las plantas por su acción en el SNC.

De acuerdo al sistema Francés, se pueden reconocer tres grandes clases de plantas por su “actividad mental” o efecto sobre el SNC (Shepherd, 1972; Carlini, 2003). En el Cuadro 1, se definen estas clases y se proporcionan algunos ejemplos.

**Cuadro 1. Clasificación de las plantas de acuerdo a su efecto en el SNC**

(Shepherd, 1972; Carlini, 2003)

	Definición	Ejemplos
Plantas psicoanalépticas	Grupo capaz de provocar una elevación del tono mental, aunque su acción puede mejorar la actividad intelectual o incrementar la alerta. Se utilizan principalmente por su actividad anoréxica y sus propiedades reductoras del peso corporal.	<i>Ephedra sinica</i> <i>Ephedra spp.</i> <i>Paullinia sp.</i> <i>Thea sinensis</i> <i>Ilex paraguariensis</i> <i>Catha edulis</i>
Plantas psicodislépticas	Grupo que provoca desviación de la actividad mental y distorsión de la apreciación de la realidad.	<i>Banisteriopsis caapi</i> <i>Psychotria viridis</i> <i>Tabernanathe iboga</i>
Plantas psicolépticas	Grupo que provee una disminución en el tono mental, su principal acción es mantener una reducción de la actividad intelectual, o la disminución de la alerta.	
Plantas analgésicas	Tienen propiedades analgésicas.	<i>Papaver somniferun</i> <i>Cannabis sativa</i> <i>Salix alba</i>
Plantas ansiolíticas	Minimizan la tensión, stress y la ansiedad.	<i>Passiflora incarnata</i> <i>Valeriana officinalis</i> <i>Piper methysticum</i>

## 1.2 Plantas con actividad neurofarmacológica documentada.

Existen una gran cantidad de plantas cuya actividad sobre el Sistema Nervioso Central ha sido documentada, en el Cuadro 2 se enumeran algunas de las más relevantes.

<b>Cuadro 2. Plantas más relevantes con actividad neurofarmacológica.</b>			
<b>Nombre común</b>	<b>Nombre científico</b>	<b>Actividad</b>	<b>Referencia</b>
Valeriana	<i>Valeriana officinalis</i> <i>Valeriana wallichii</i> <i>Valeriana edulis</i>	Depresora del SNC Antiespasmódica	Hendriks <i>et al.</i> , 1985
Pasiflora	<i>Pasiflora incarnata</i>	Ansiolítica Hipnótica Espasmódica	Speroni <i>et al.</i> , 1988
Lúpulo	<i>Humulus lupulus</i>	Sedante-hipnótica	López-Luengo <i>et al.</i> , 1999
Kava-kava	<i>Piper methysticum</i>	Sedante-hipnótica Miorrelajante Anticonvulsivante Analgésica	Pittler <i>et al.</i> , 2000
Amapola de California	<i>Eschscholzia californica</i>	Sedante hipnótica	Sala y Vallés, 1993
Carpintera	<i>Justicia pectoralis</i>	Ansiolítica	Fernández <i>et al.</i> , 1989
Calderona amarilla	<i>Galphimia glauca</i>	Hipnótica	Tortoriello y Romero, 1992
Planta de San Juan	<i>Hypericum perforatum</i>	Espasmolítica Ansiolítica Antidepresiva Estimulante del SNC	Di Carlo <i>et al.</i> , 2001 Barnes <i>et al.</i> , 2001
Ginseng	<i>Panax quinquefolium</i> <i>Panax ginseng</i>	Analgésica Antiinflamatoria Depresora del SNC	Attele <i>et al.</i> , 1999
Ginkgo	<i>Ginkgo biloba</i>	Analgésica Antiinflamatorios	Klein <i>et al.</i> , 1997
Lavándula	<i>Lavandula stoechas</i> <i>Lavandula officinalis</i>	Sedante-hipnótica	Gilani <i>et al.</i> , 2000
Ilama zapote	<i>Annona diversifolia</i>	Antiepiléptica	González-Trujano <i>et al.</i> , 2006
Flor de tila	<i>Ternstroemia pringlei</i> <i>Ternstroemia sylvatica</i>	Sedante Anticonvulsivante	Molina <i>et al.</i> , 1999 Aguilar-Santamaría y Tortoriello, 1996

De las plantas mencionadas en el Cuadro 2, destaca la “Flor de Tila” como una de las más usadas en el país por su efecto “tranquilizante” y que es el objeto de este estudio.



## 2. Familia *Ternstroemiaceae*.

Las *Ternstroemiaceae* es una familia de plantas vasculares con una amplia distribución mundial, tradicionalmente ha sido incluida dentro de la familia *Theaceae* Mirb. Pero por evidencias morfológicas, moleculares y embriológicas, se considera que no se ajustan a un solo grupo monofilético (Luna, 1997).

Las especies de *Ternstroemiaceae* son arbustos o árboles pequeños a gran tamaño, con una amplia distribución en los trópicos y subtrópicos; algunos de los géneros exclusivamente habitan Asia oriental (*Adinandra*, *Anneslea*, *Archboldiodendron*, *Eurya* y *Euryodendron*), África (*Balthasaria* y *Visnea*), América (*Freziera* y *Symplocarpon*), o dos (*Cleyera*) o más continentes. (Luna *et al.*, 2004)

Sólo cuatro géneros se encuentran en México: *Cleyera*, *Freziera*, *Symplocarpon* y *Ternstroemia*, que incluyen a aproximadamente 11 especies (Boom, 1989; Luna *et al.*, 2004).

### 2.1 Género *Ternstroemia* Mutis ex L.f.

El género *Ternstroemia* Mutis ex L.f. comprende alrededor de 130 especies ampliamente distribuidas en el mundo (Asia, África, América y Australia) principalmente en las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. En los neotrópicos se encuentran la mayoría de las especies, principalmente en el norte de Sudamérica. (Boom, 1989; Luna *et al.*, 2004)

Las especies de este género se encuentran frecuentemente en temperaturas de condiciones de montaña, como los bosques nublados y los bosques húmedos de roble, especialmente a 1000-2700 metros de altitud. (Alcántara *et al.*, 2002; Luna *et al.*, 2004)

En México, se encuentran en los bosques de pino y roble de la Sierra Madre Oriental, de las Serranía Meridionales Transísmicas (Alcántara *et al.*, 2002).

Once especies del género *Ternstroemia* se han descrito en nuestro país a lo largo de todo su territorio. (Luna, 1997) En el Cuadro 3 se muestran las especies reportadas en México y en el Mundo.

**Cuadro 3. Especies del género *Ternstroemia* Mutis ex. L.f. encontradas en México y en el Mundo (Luna, 1997).**

Especie, Subespecie y Variedad	País del Mundo en que se encuentra	Estado de México en que se encuentra
<i>T. brasiliensis</i> Camb.	Brasil	-
<i>T. circunsissilis</i>	Bolivia	-
<i>T. denstisepala</i> Bartholomew	México	Jalisco
<i>T. gymnanthera</i> (Wight et Arn.) Sprague	China Japón	-
<i>T. hartii</i> Krug & Urb.	Jamaica	-
<i>T. hemsleyi</i> Hochr.	México	Oaxaca Veracruz
<i>T. heptasepala</i> Krug & Urb	Puerto Rico	-
<i>T. huasteca</i> Bartholomew	México	Hidalgo
<i>T. impressa</i> Lundeeii	México	Chiapas
<i>T. japonica</i> Thumb.	China Japón	-
<i>T. japonica</i> Thumb. var. <i>wighii</i> Dyer	China	-
<i>T. jelskii</i> (Szyszyl) Melchior	Perú	-
<i>T. klugiana</i> Kobuski	Perú	-
<i>T. kwangtungensis</i> Merr.	China	-
<i>T. lineata</i> DC. ssp. <i>lineata</i>	México	Jalisco Estado de México Michoacán Oaxaca
<i>T. lineata</i> DC. ssp. <i>chalicophila</i> (Loes) Bartholomew	México	Chiapas
<i>T. oocarpa</i> (Rose) Melchior	México	Chiapas
<i>T. penduncularis</i> DC	Dominica República Dominicana	-
<i>T. pendoliflora</i> Kobuski	Perú	-
<i>T. pringlei</i> (Rose) Standley	México	Jalisco Estado de México Michoacán
<i>T. pseudoverticillata</i> Merr & Chun	China	-
<i>T. punctata</i> (Aubl.) Sw.	Brasil	-
<i>T. seemanii</i> Triana & Planc	Guatemala Honduras	Chiapas Oaxaca
<i>T. stahlia</i> Krug & Urb	México Puerto Rico	Veracruz -
<i>T. sylvatica</i> Schldl. & Cham.	México	Hidalgo Veracruz
<i>T. tepezapote</i> Schldl. & Cham.	México	Veracruz
<i>T. cf. toquian</i>	Filipinas	-

## 2.2 Flor de Tila.

Algunas especies de género *Ternstroemia* se les conocen en México como “Tila” o “Flor de Tila”. La decocción de la “Flor de Tila” se usa tradicionalmente y con bastante frecuencia en tratamiento de los “nervios” o “calmante de los nervios”, como emoliente, sedante y para tratar el reumatismo. Los frutos secos, que tienen forma de flor, son las partes más utilizadas. (Rzedowski y Rzedowski, 1985)

Dos de las especies de *Ternstroemia*, pertenecientes al conjunto de Flor de Tila, que se encuentran a lo largo de nuestro país son: *T. pringlei* (Rose) Standley y *T. sylvatica* Schl. & Cham. A continuación se describirán algunas de las características de cada una de ellas.

### 2.2.1 *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standley

**Nombres comunes.** *Charapiti ucu* (purépecha), Cucharillo, Jaboncillo, Tila, Tila grande, Trompillo.

**Descripción.** Arbusto o árbol de 1.5 a 15 metros de alto, flores blancas y fruto duro de color café parecido a una flor, flores axilares, solitarias situadas en la base del cáliz, pétalos blancos, orbiculares de 1 a 1.5 cm de largo y ancho, unidos muy en la base; semillas de 8 mm de largo por 5 mm de ancho, rodeadas por un arillo consistente de papilas o pelos carnosos (Rzedowski y Rzedowski, 1985).

**Uso artesanal.** El tallo se emplea en la elaboración de cucharas, molinillos, guitarras y cuentas de collares (Semarnat, 2006).

**Uso medicinal.** La infusión de la flor tiene una acción sedante por lo que se recomienda para calmar los nervios. Se cuece la flor de tila y canela en 250 mL de agua durante 10 minutos, dejándose reposar por 5 minutos, se toma por la noche para curar la tos. El cocimiento de las hojas se utiliza en baños contra los dolores reumáticos. El té preparado con la parte aérea de la planta, tila, té de limón, manzanilla y valeriana se recomienda para los nervios alterados. Contra el insomnio, se toma un té después de la cena; también se prepara en tintura y se toman ocho gotas disueltas en agua (Rzedowski y Rzedowski, 1985).

**Hábitat.** Se desarrolla en bosques de pino-encino en bosques mixtos con latifoliadas, a una de altitud de 2120 metros.

**Comercialización.** Se emplea en autoconsumo y se comercializa en seco, mezclado con otras plantas o sola. Se vende tanto en puestos ambulantes, mercados públicos, como en puestos de venta de productos naturales.

**Distribución.**

**Guerrero:** Coyuca de Catalán, Alcozauca de Guerrero. **Jalisco:** Cuautitlán. **Michoacán:** Acuitzio, Uruapan, Zinapécuaro, Zitacuaro, Coalcoman de Vázquez Pallarez, Cotija, Aguililla, Charapan, Charo, Hidalgo, Indaparapeo, Madero, Angangueo, Morelia, Nuevo Parangaricutiro, Ocampo, Patzcuaro, Aporo, Querendaro, Quiroga, Los Reyes, Salvador Escalante, Tingambato (Semarnat 2006).



Figura 1. *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standl.

**2.2.2 Ternstroemia sylvatica Schl. & Cham.**

**Nombres comunes:** Trompillo, hierba del cura, Tila grande. (Rzedowski y Rzedowski, 1985; Reiche, 1977; Sánchez, 1979; Semarnat, 2006)

**Descripción.** Arbusto o árbol de 1.5 a 5 metros de alto, flores con pétalos blancos, suborbiculares de 6 a 6.5 mm de largo, por un poco menos de ancho unidos muy en la base, fruto cónico u ovoide de 1.5 cm de largo excluyendo el estilo persistente; semillas de 1 cm de largo por 0.6 de ancho, rodeadas por un arillo consistente de pelos carnosos; flores blancas o blanco-cremosas; hojas alternas oblongo-ovaladas de 4-6 cm de largo por 2-2.5 cm de ancho. (Rzedowski y Rzedowski, 1985; Reiche, 1977; Sánchez, 1979)

**Uso medicinal.** Los frutos se utilizan para hacer té con propiedades relajantes y para el tratamiento de los nervios.

**Hábitat.** Planta muy común en las zonas boscosas del noreste de la zona del Bajío, en pinares, encinares, bosques de *Cupressus* y mesófilos de montaña, a una altitud de 1200-2700 metros.

**Distribución.** Principalmente hacia la vertiente del Golfo de México, sobre la Sierra Madre oriental, Tamaulipas, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Distrito Federal, México, Puebla, Veracruz y Oaxaca. (Semarnat, 2006)



Figura 2. *Ternstroemia sylvatica* Schl. & Cham.

### 3. Estudios realizados a plantas del género *Ternstroemia*.

#### 3.1 Estudios fitoquímicos.

Pocas especies del género *Ternstroemia* han sido estudiadas fitoquímicamente. Los metabolitos secundarios aislados de plantas del género corresponden principalmente a:

- Monoterpenoides
- Carotenoides y compuestos alifáticos
- Compuestos aromáticos
- Triterpenoides tipo ursano, oleanano y saponinas

En el Cuadro 4 se enumeran algunas de las sustancias aisladas de plantas del género *Ternstroemia*. Asimismo, en la Figura 3 se muestran sus estructuras.

**Cuadro 4. Metabolitos aislados de plantas del género *Ternstroemia*.**

Sustancia	Tipo	Especie	Parte de la planta y/o extracto	Estructura	Referencia
Terpenoides	Derivados de monoterpenoides, sesquiterpenoides	<i>T. gymnanthera</i>	Hojas y tallos	1-7	Tori <i>et al.</i> , 2005
Saponinas glicosiladas y agliconas	Triterpenos	<i>T. japonica</i>	Extracto MeOH de frutos	8	Hee <i>et al.</i> , 2003
Lactona del ácido 3- <i>epi</i> -corosólico			Extracto	9	
Ácido 3- <i>epi</i> -ternstroemico	Triterpenos	<i>T. gymnanthera</i>	MeOH de cultivos de callos	10	Ikuta <i>et al.</i> , 2003
Ácido ternstroémico				11	
Ácido gymnanterárico				12	
Jacaranona				13	
3-hidroxi-2,3-dihidrojacaranona	Derivados de monoterpenoides	<i>T. japonica</i>	Extracto MeOH de frutos	14	Jo <i>et al.</i> , 2005
3-metoxi-2,3-dihidrojacaranona				15	
Ácido ursólico	Triterpeno			16	
Ácido oleanólico				17	
Primulagenina A			Extracto	-	
Dihidroprimulagenina A	Triterpenos	<i>T. japonica</i>	MeOH de semillas	-	Yoshioca <i>et al.</i> , 1972
A <sub>1</sub> -Barrigenol				-	
Ternstroemioxantina	Carotenoide	<i>T. japonica</i>	Extracto acetónico	18	Kikuchi y Yamaguchi, 1974
Jacaranona	Derivado de monoterpenoide	<i>T. pringlei</i>	Extracto MeOH	13	Lozada-Lechuga <i>et al.</i> , 2010

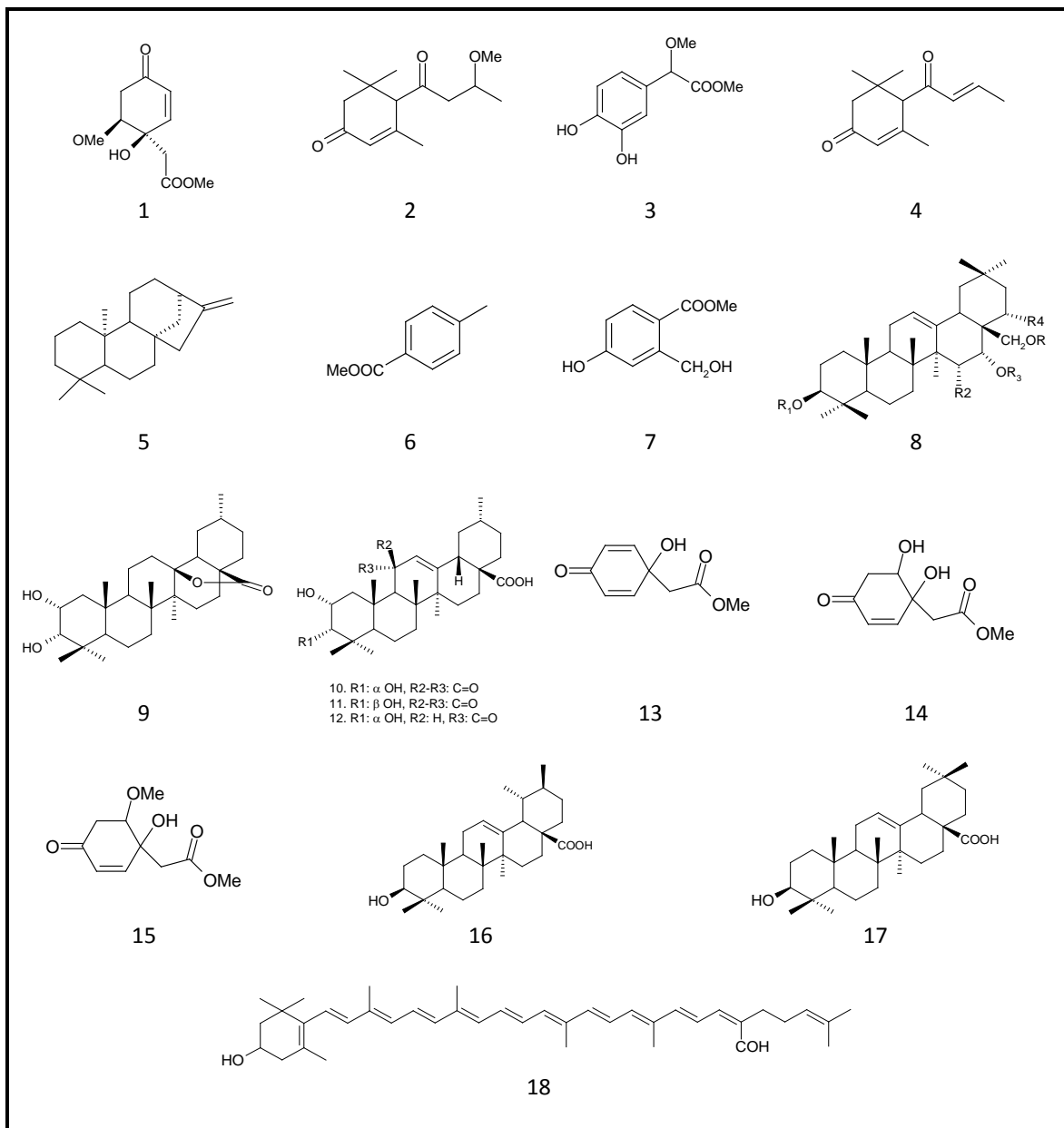


Figura 3. Estructuras de algunos metabolitos aislados de plantas del género *Ternstroemia*.

### 3.2 Estudios Farmacológicos.

Las plantas del género *Ternstroemia* presentan una amplia variedad de actividades farmacológicas comprobadas en estudios preclínicos, tanto en animales como en estudios *in vitro*. En el Cuadro 5 se mencionan las actividades farmacológicas más importantes que se les ha determinado.

**Cuadro 5. Actividades farmacológicas determinadas de plantas del género *Ternstroemia*.**

Actividad farmacológica	Especie	Responsable de la actividad	Referencia
Anticonvulsivante Inhibición de la contracción en íleon de cobayo	<i>T. pringlei</i>	Extracto metanólico de flores	Aguilar-Santamaría y Tortoriello, 1996
Anti VIH	<i>T. gymnanthera</i>	Ácido oleanólico	Tori <i>et al.</i> , 2005
Antioxidante	<i>T. japonica</i>	Jacaranona y derivados	Jo <i>et al.</i> , 2005
Sedante	<i>T. sylvatica</i>	Extracto acuoso de flores	Molina, 1999
Adhesivas	<i>T. gymnanthera</i>	Taninos	Luo <i>et al.</i> , 1994
Astringente	<i>T. gymnanthera</i>	Taninos	Chen <i>et al.</i> , 1989
Insecticida contra termitas	<i>T. japonica</i>	Saponinas	Saeki <i>et al.</i> , 1968
Citotóxica	<i>T. gitingensis</i>	Extracto metanólico de raíces	Horgen <i>et al.</i> , 2001
Sedante	<i>T. pringlei</i>	Jacaranona	Lozada-Lechuga <i>et al.</i> , 2010



### 3.2.1 Estudios farmacológicos realizados a *T. pringlei* y *T. sylvatica*.

En México, *Ternstroemia sylvatica* y *Ternstroemia pringlei* son recomendadas para disminuir la ansiedad y el insomnio.

En trabajos experimentales previos se ha encontrado que *Ternstroemia sylvatica* tiene efecto sedante en ratas (Molina, 1999); mientras que *Ternstroemia pringlei* produce efectos sedante y anticonvulsivante en ratas (Aguilar-Santamaría y Tortoriello, 1996). En ambos estudios no se determinaron las ventanas de actividad, efectos tóxicos y las sustancias responsables de dichos efectos.

En nuestro grupo de investigación se estableció que el extracto acuoso de *T. pringlei* interacciona con varios tipos de fármacos sedantes (buspirona, pentobarbital, diazepam, difenhidramina y haloperidol) para producir un efecto superaditivo y, con etanol un efecto subaditivo, sin embargo, aún no se ha establecido el o los mecanismos por los cuales interacciona (Balderas *et al.*, 2008).

Lozada-lechuga y cols. (2010), utilizando el ensayo de potenciación de la hipnosis inducida por pentobarbital, logró aislar a la jacaranona (estructura 13, Figura 3) del extracto metanólico de *T. pringlei* como una de las sustancias responsables del efecto sedante de la planta ( $DE_{50} = 25$  mg/kg), y que muestra actividad tóxica ( $DL_{50} = 150-200$  mg/kg). Asimismo, determinaron que el extracto acuoso y el metanólico promueven la liberación de GABA.

## 4. Sedación.

Los términos sedante, hipnótico y tranquilizante no son sinónimos, aunque cualquiera de ellos puede iniciar los efectos de cualquier otro. El término **sedación** implica una disminución lenta del funcionamiento cognitivo, mientras que **hipnosis** especialmente significa inducción del sueño por sí mismo. **Tranquilización**, de otra manera, significa una calma emocional, que puede o no llevar al sueño, pero no induce el sentimiento de somnolencia (Wheatley, 2005).

Además, se usa el término sedación para designar a la supresión leve de la vigilia y la conducta, con reducción moderada del estado de alerta y de las respuestas a los estímulos (Kalant y Roschlau, 2002).

El concepto de **fármaco sedante** no corresponde a una acción farmacológica exacta. Las moléculas sedantes son definidas como sustancias que disminuyen, con frecuencia en correspondencia al incremento de la dosis, el desempeño psicomotor en animales así como en seres humanos. Dichas sustancias son fármacos psicotrópicos que pertenecen a la familia de los hipnóticos, neurolépticos, ansiolíticos, antidepresivos y antihistamínicos. No se conoce por completo el mecanismo de sedación producido por los fármacos sedantes debido a la complejidad de sus acciones (Bourin *et al.*, 2002; Kalant y Roschlau, 2002).

Los fármacos sedantes poseen varias características importantes (Kalant y Roschlau, 2002):

1. Actúan sobre vías postsinápticas.
2. Suelen aumentar la inhibición presináptica.
3. Las diferentes partes del encéfalo tienen sensibilidades distintas a ellas (selectividad y especificidad regionales).
4. Aumentan los efectos presinápticos del GABA.

Con frecuencia en la clínica, la sedación es un efecto secundario no deseable después de la utilización de esos fármacos. Esta es la razón por la que los fármacos sedantes son usados en pre-anestesia o agitación, o hasta en fenómenos de agresividad (Bourin *et al.*, 2002).

### 4.1 Medición de la actividad sedante.

Las propiedades sedantes de fármacos son probadas principalmente en ratas y ratones midiendo su actividad motora espontánea. Su actividad motora espontánea depende de varios factores, tales como situación social (uno o más animales), familiaridad con el ambiente de la prueba, luz y temperatura. El término actividad espontánea incluye diferentes tipos de movimientos tales como locomoción, levantamiento, olfateo, comer y beber (Vogel y Vogel, 2008).

En el Cuadro 6 se enumeran los métodos generales de medición de la actividad sedante en animales y seres humanos.

<b>Cuadro 6. Métodos para medir la actividad sedante</b> (Bourin <i>et al.</i> , 2002, Oliva, <i>et al.</i> , 2004)	
<b>Animales</b>	<b>Seres Humanos</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Medición de la actividad motora espontánea</li><li>• Potenciación del efecto de barbitúricos</li><li>• Cilindro de exploración</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Prueba de sustitución de símbolo-dígito</li><li>• Tiempo de reacción de selección</li><li>• Fusión de parpadeo crítico</li><li>• Valoración subjetiva</li><li>• Cuestionario de efectos secundarios</li></ul>

## HIPÓTESIS

*Ternstroemia pringlei* y *Ternstroemia sylvatica* poseen metabolitos secundarios de la familia de los terpenoides con actividad farmacológica sedante, la cual puede ser detectada mediante pruebas de actividad neurotrópica en ratón para llevar a cabo un aislamiento biodirigido.

## OBJETIVOS

### General

Realizar los estudios farmacológico y químico biodirigido de los extractos de *Ternstroemia pringlei* y de *Ternstroemia sylvatica* para aislar e identificar a los metabolitos secundarios responsables de la actividad sedante.

### Específicos

1. Evaluar el efecto sedante de los extractos obtenidos con disolventes orgánicos y con agua de *Ternstroemia pringlei* y de *Ternstroemia sylvatica* por medio de la prueba del cilindro de exploración en ratones.
2. Determinar el perfil neurofarmacológico a los extractos más activos, para determinar la existencia de actividad a nivel del sistema nervioso central y tipo de actividad.
3. Aislar, identificar y elucidar la estructura de los metabolitos secundarios activos presentes en los extractos de ambas especies de *Ternstroemia*.
4. Determinar la toxicidad (DL<sub>50</sub>) de la administración aguda de los extractos y/o compuestos en ratones.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Animales

#### a) Ratones

Todos los experimentos de comportamiento se realizaron en ratones adultos machos ICR (25-34 g, Centro UNAM-Harlan, Harlan México, S.A. de C.V.). Los grupos experimentales consistieron de al menos 6 animales. Los animales se mantuvieron en una habitación a temperatura constante ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y sometidos a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno con libre acceso a agua y alimento. Todas las evaluaciones del comportamiento se llevaron a cabo entre las 10:00 y 14:00 horas.

#### b) Ratas

Todas las evaluaciones de parámetros hematológicos se realizaron en ratas adultas machos Wistar (180-200 g, Centro UNAM-Harlan, Harlan México, S.A. de C.V.). Los grupos experimentales consistieron de al menos 4 animales. Los animales se mantuvieron en una habitación a temperatura constante ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y sometidos a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno con libre acceso a agua y alimento. Todas las evaluaciones hematológicas se llevaron a cabo entre las 8:00 y 11:00 horas.

Todos los experimentos que involucraron animales así como su mantenimiento y cuidado, se llevaron a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y de acuerdo con las normas internacionales de cuidado y uso de animales de laboratorio.

### Colecta del material vegetal.

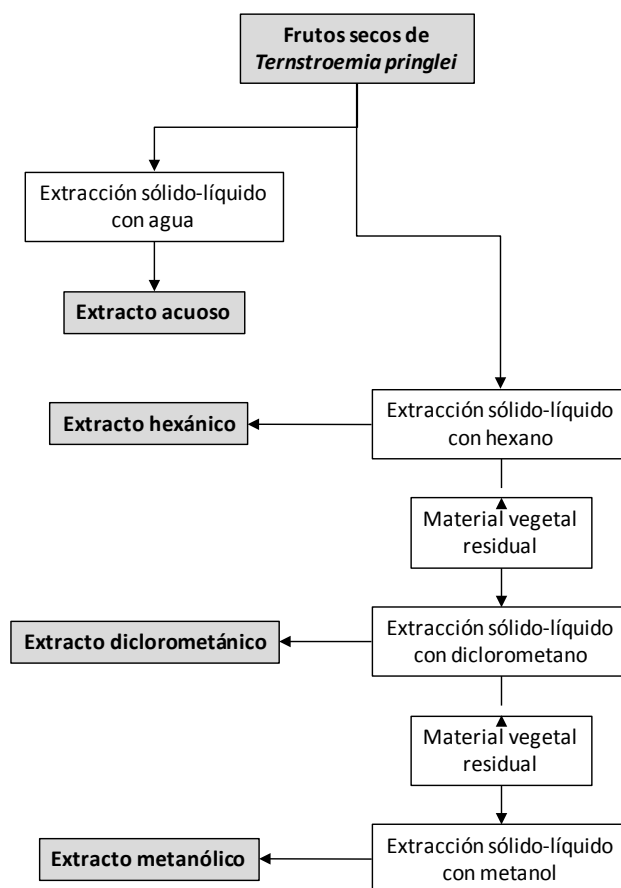
Los frutos secos de *Ternstroemia sylvatica* y *Ternstroemia pringlei* se colectaron en junio del 2007 en Pahuatlán, Estado de Puebla, México. La homogeneidad y autenticidad de los frutos fueron certificadas por el Herbario de la FES Iztacala, UNAM por la Bióloga Edith López. Muestras de las plantas se depositaron en este herbario con los número de registro IZTA42169 para *T. pringlei* e IZTA42170 para *T. sylvatica*. Los frutos se almacenaron hasta su estudio en un lugar fresco y seco.

## Preparación de los extractos.

### a) *Ternstroemia pringlei*

Después de moler los frutos secos con un molino manual, una muestra de 443 g se extrajeron por maceración a temperatura ambiente con hexano (3 veces con 2 L por 24 horas cada uno), posteriormente con diclorometano (3 veces con 2 L por 24 horas cada uno), y por último con metanol (3 veces con 2 L por 24 horas cada uno). Después de la evaporación de los disolventes a presión reducida se obtuvieron 0.94 g (0.21% de rendimiento) de extracto hexánico, 2.1 g de extracto de diclorometano (0.47% de rendimiento) y 152.7 g de extracto metanólico (34.46% de rendimiento). El extracto acuoso se preparó con 10 g de frutos secos y molidos en 90 mL de agua a ebullición por 10 minutos. Posteriormente el extracto se filtró por gravedad y concentrado por una corriente de aire a temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) obteniéndose 1.52 g (15.2% de rendimiento) de un sólido cristalino rojizo.

El esquema general de la preparación de los extractos se ilustra en la siguiente Figura.

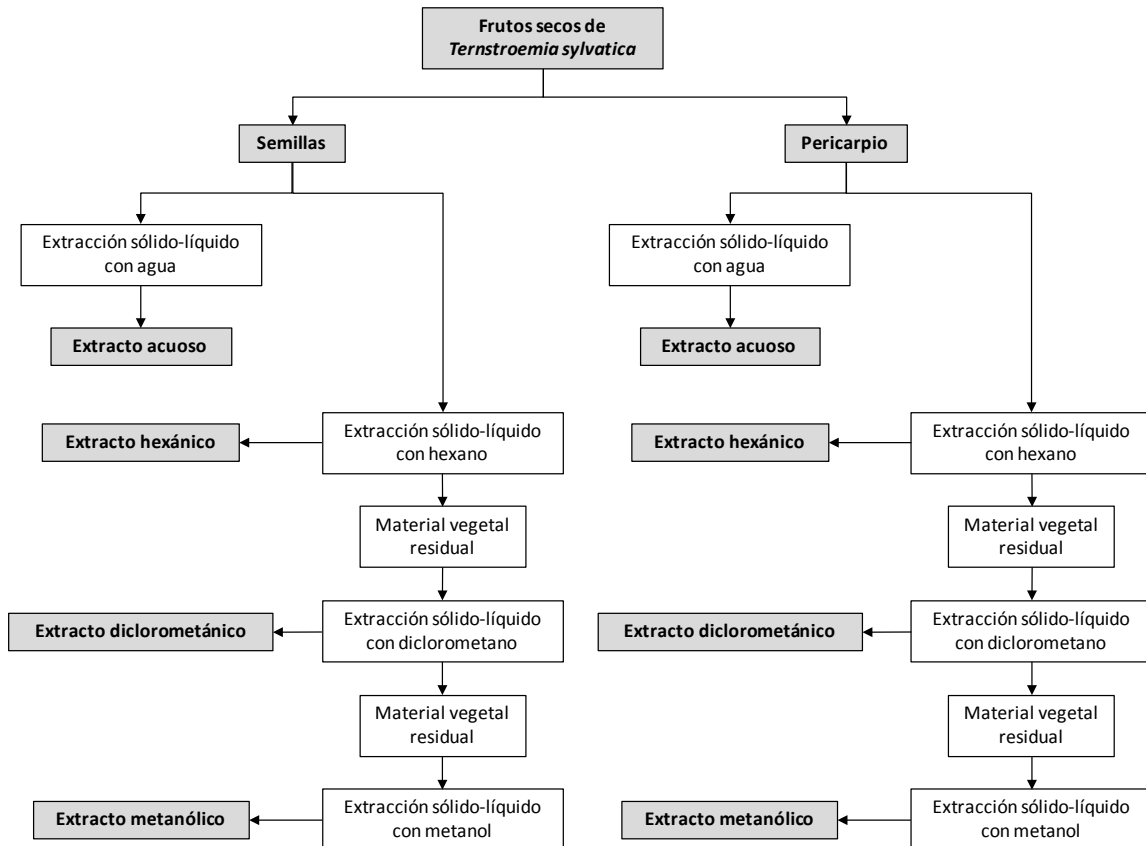


**Figura 4.** Esquema de preparación de los extractos orgánicos y acuoso de *Ternstroemia pringlei*.

**a) *Ternstroemia sylvatica***

Los frutos secos de *Ternstroemia sylvatica* fueron separados manualmente en semillas y pericarpio. Después de triturar con un molino manual, 56.2 g de semillas y 374 g de pericarpio se extrajeron por maceración a temperatura ambiente con hexano (3 veces con 2 L por 24 horas cada uno), posteriormente con diclorometano (3 veces con 2 L por 24 horas cada uno), y por último con metanol (3 veces con 2 L por 24 horas cada uno). La evaporación de los disolventes a presión reducida se obtuvieron 1.44 g de extracto hexánico (0.39% de rendimiento), 2.01 g de extracto de diclorometano (0.54% de rendimiento) y 50.17 g de extracto metanólico (13.41% de rendimiento) para pericarpio y 17.59 g de extracto hexánico (31.30% de rendimiento), 5.51 g de extracto de diclorometano (9.81% de rendimiento) y 3.80 g de extracto metanólico (6.76% de rendimiento) para semillas. Los extractos acuosos se prepararon con 10 g de semillas o con 10 g de pericarpio en 90 mL de agua en ebullición por 10 minutos. Posteriormente los extractos se filtraron por gravedad y concentrados por una corriente de aire a temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) obteniéndose 1.40 g (13.99% de rendimiento) de un sólido cristalino rojizo para el pericarpio y 1.42 g (14.23% de rendimiento) de un sólido rojo pálido para semillas.

El esquema general de la preparación de los extractos se ilustra en la siguiente Figura.



**Figura 5.** Esquema de preparación de los extractos orgánicos y acuoso de *Ternstroemia sylvatica*.

## Fármacos y sustancias.

El diacepam se adquirió de Roche S.A. (México). El tween 80 se adquirió de Sigma-Aldrich (México). El pentobarbital sódico (Anestosal) fue adquirido de Pfizer S.A. de C.V. (México) como solución farmacéutica de uso veterinario.

Los extractos hexánicos y de diclorometano, y el diacepam se suspendieron en una solución de 0.5% de Tween 80 en disolución salina (0.9%). Los extractos acuosos y metanólicos se disolvieron en disolución salina (0.9%). Las disoluciones de fármacos y extractos se prepararon momentos antes de cada sesión experimental y se administraron por vía intraperitoneal o por vía oral en un volumen de 0.1 mL/10 g de peso. Los animales de los grupos control recibieron el mismo volumen de vehículo (0.5% de Tween 80 en disolución salina o sólo disolución salina).

## Pruebas farmacológicas.

### a) Cilindro de exploración (*Exploratory Cylinder Test*)

El aparato consiste en un cilindro de vidrio (30 cm de alto y 11 cm de diámetro interno con paredes de 3 mm). El cilindro es colocado sobre un papel filtro en un sitio con iluminación constante y aislado del ruido externo, como se muestra en la Figura 6 (Hiller y Zetler, 1996; Oliva *et al.*, 2004; Ugalde *et al.*, 2005).

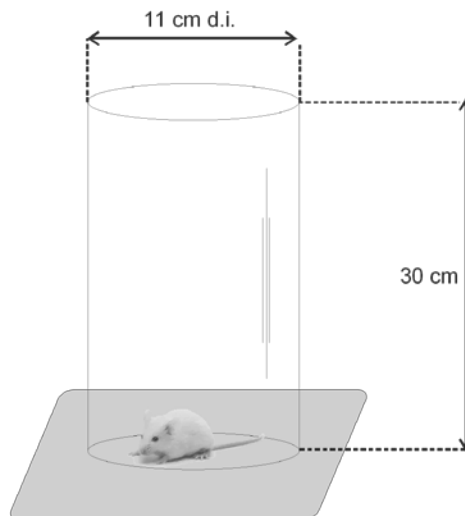


Figura 6. Esquema del dispositivo para la prueba del cilindro de exploración.

Un ratón novato (*naïve*) se colocó dentro del cilindro sobre el papel filtro y el número de levantamientos en un periodo de 5 minutos fue registrado. La cara interna del cilindro se limpió con disolución alcohólica al 20% y el papel filtro fue cambiado entre cada sesión de prueba de



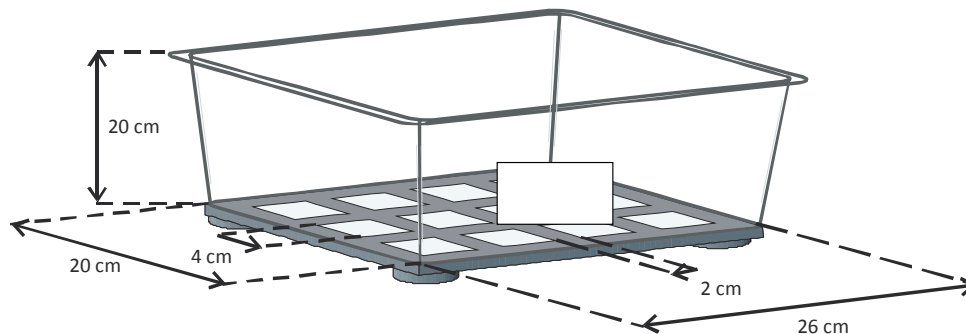
cada animal (Oliva *et al.*, 2004). Los extractos y fármacos se administraron a diferentes dosis 30 minutos antes de la prueba. Durante el periodo de observación, el experimentador permaneció quieto cerca del cilindro y siempre en el mismo lugar. La reducción del número de levantamientos mostrado por un ratón *naïve* después de ser colocado en un ambiente no familiar revela un efecto sedante (Hiller y Zetler, 1996; Rolland *et al.*, 1991; Oliva *et al.*, 2004).

### b) Toxicidad aguda (DL<sub>50</sub>)

La toxicidad aguda de los extractos fue estimada por vía intraperitoneal y por vía oral usando los mismos grupos de ratones que se utilizaron en las determinaciones del cilindro de exploración. Los ratones, después de las sesiones experimentales, se mantuvieron bajo observación por los siguientes 14 días en una habitación a temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y se sometieron a ciclos de luz/oscuridad por periodos de 12 horas y con libre acceso a alimento y agua. Sus pesos se registraron diariamente y al final del estudio se sacrificaron los ratones sobrevivientes y se realizó una evaluación macroscópica de los tejidos.

### c) Prueba de campo abierto (*Open Field Test*)

Treinta minutos después de la administración de los extractos, cada ratón se colocó en una caja de acrílico con el fondo dividido en 12 Cuadros (4 x 4 cm) con líneas de 2 cm de ancho. El número de Cuadros explorados por cada ratón en un intervalo de 2 minutos se registró como actividad exploratoria. El esquema del modelo puede observarse en la Figura 7.



**Figura 7.** Esquema del dispositivo para la prueba de campo abierto u *Open Field Test*.

#### d) Inhibición de las convulsiones producidas por pentilentetrazol.

El pentilentetrazol (PTZ) a una dosis de 120 mg/kg por vía intraperitoneal se administró 32 minutos después de la administración de los extractos e inmediatamente después del experimento de campo abierto. Se registró la latencia de aparición de la primera convulsión clónica y tónica. A los animales del grupo control sólo se les administró el vehículo antes de la administración del PTZ. Si en un tiempo límite de 30 minutos no se presentaron convulsiones y/o muerte, los animales se consideraron como protegidos de las convulsiones. El diacepam se utilizó como fármaco de referencia (Swinyard *et al.*, 1989).

#### e) Prueba del tablero de hoyos (*Hole Board Test*).

Treinta minutos después de la administración de los extractos por vía intraperitoneal, cada ratón se colocó en un tablero de 40 cm x 40 cm x 2 cm con 16 orificios centrados y equidistantes de 3 cm de diámetro interno. El tablero se levantó por dos soportes de aluminio a 25 cm del nivel del piso. El número de hoyos explorados (*nose-poking*) se midió durante 3 minutos. Una disminución en el número de hoyos explorados revela una actividad ansiolítica. El esquema del modelo puede observarse en la Figura 8 (Vogel y Vogel, 1997).

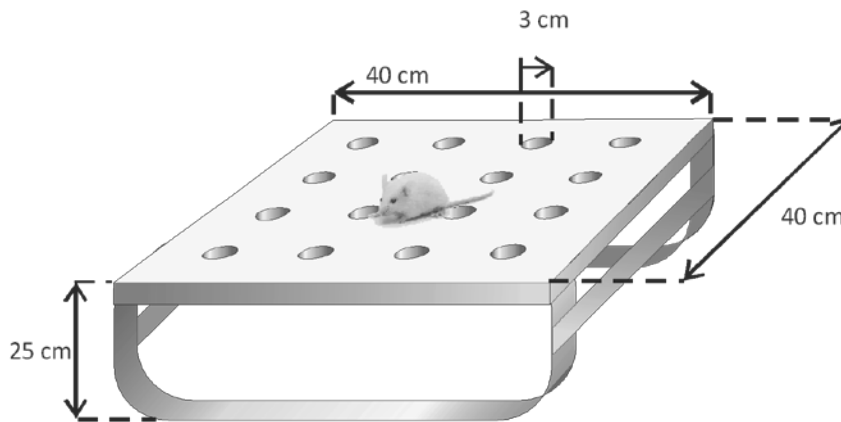


Figura 8. Esquema del dispositivo para la prueba del tablero de hoyos o *Hole board Test*.

#### f) Hipnosis inducida por pentobarbital.

El pentobarbital sódico a una dosis de 60 mg/kg se administró por vía intraperitoneal 33 minutos después de la administración de los extractos e inmediatamente después de la prueba del tablero de hoyos. Cada ratón se observó y se registró el tiempo al que perdió el reflejo de enderezamiento (latencia de hipnosis) y el tiempo al cual recuperó el mismo reflejo. El tiempo entre la pérdida y la recuperación del reflejo de enderezamiento se registró como duración de la hipnosis (González-Trujano *et al.*, 2006).

### g) Efecto sobre la coordinación motora (prueba de *Rota-rod*).

Para esta prueba sólo se utilizaron los animales que demostraron la habilidad para permanecer en el cilindro giratorio por al menos 120 segundos. Los ratones se colocaron inmediatamente después de la administración intraperitoneal de diacepam, extractos o el vehículo en el cilindro del aparato de prueba (*Rota-rod*; Ugo Basile) a 16 rpm, para registrar la actividad por 120 segundos. La actividad del ratón en el cilindro fue registrada cada 10 minutos para un total de 120 minutos. El efecto sobre la coordinación motora se consideró cuando el ratón permaneció menos de 120 segundos en el cilindro giratorio. El esquema del modelo puede observarse en la Figura 9.

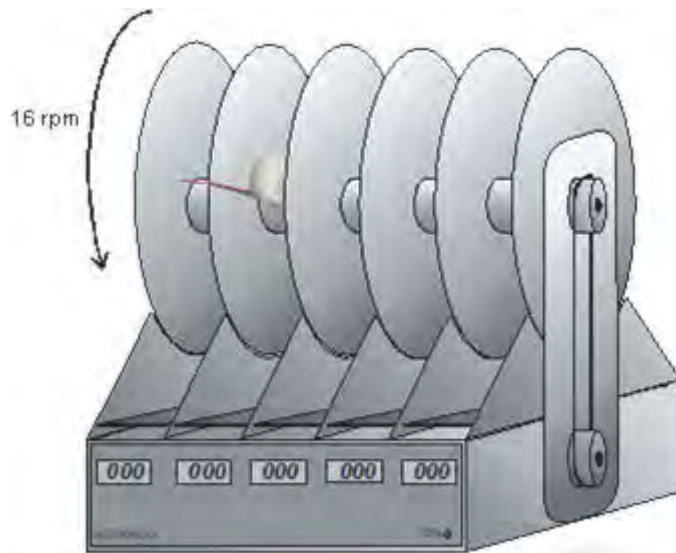


Figura 9. Esquema del dispositivo para la prueba de *Rota-rod*.

### h) Prueba de miorrelajación (*Grip Strenght Test*).

La prueba de miorrelajación se realizó usando una barra metálica de 2 mm de diámetro y 60 cm de largo, colocado horizontalmente a una altura de 40 cm. Los ratones se colgaron con sus patas delanteras por 30 segundos y se agarró su cola de manera que no pudiera utilizar sus patas traseras para sujetarse. Sólo los ratones que cumplieron con este criterio se incluyeron en la prueba. Después de la administración de los extractos, del diacepam o del vehículo, e inmediatamente después de la prueba de rota-rod, los ratones fueron colocados en la barra metálica y su actividad se registró por 30 segundos cada 10 minutos hasta completar 120 minutos. El efecto en la función neuromuscular se consideró cuando el ratón cae de la barra metálica antes de los 30 segundos. El esquema del modelo puede observarse en la Figura 10 (Vogel y Vogel, 1997).

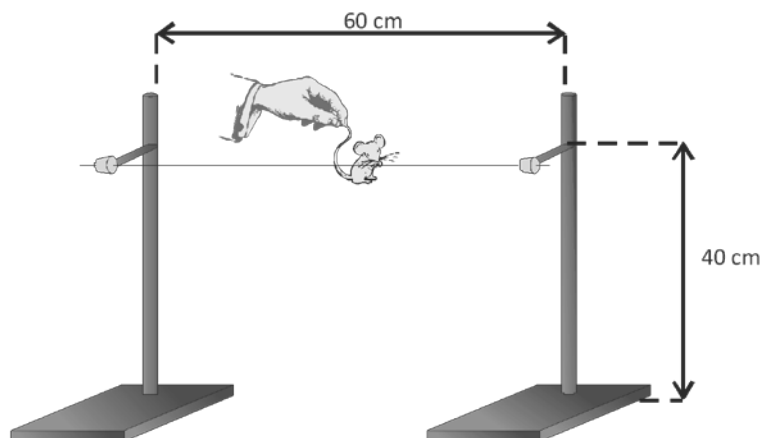


Figura 10. Esquema del dispositivo para la prueba de miorelajación.

### Efecto en los parámetros hematológicos.

Los parámetros hematológicos Hemoglobina, Hematocrito, Núm. de glóbulos rojos, Volumen Corpuscular Medio, Hemoglobina Corpuscular Media, Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media, Núm. de plaquetas, Núm. de leucocitos y Volumen Plaquetario Medio, se evaluaron en ratas macho tratadas por vía intraperitoneal con el extracto acuoso de ambas plantas. Las muestras de sangre (0.2 a 0.4 mL) fueron colectadas por punción cardiaca directa en las ratas previamente anestesiadas con éter etílico a los 30, 60 y 90 minutos después de la administración de los extractos o del vehículo. Las muestras de control se colectaron antes de la administración de los extractos. Los valores de los parámetros hematológicos de las muestras se obtuvieron en un analizador hematológico *Sysmex KX21*.

### Análisis estadístico.

Los resultados son expresados como la *media ± error estándar de la media (eem)* con grupos de al menos 6 unidades experimentales. Las diferencias estadísticas se determinaron por medio de un análisis de varianza de una vía seguida por una prueba *post hoc* de Dunnett. Un valor de  $P < 0.05$  fue considerado como significativo para la existencia de diferencias. Para el análisis de los parámetros hematológicos se utilizó un análisis de varianza de dos vías seguida por una prueba *post hoc* de Bonferroni con un valor de significancia de  $P < 0.05$ .

## Estudio Químico.

### a) Ácido 3-epi-ursólico (I).

De las fracciones 53-65 eluidas con una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  (8:2), del extracto metanólico de los frutos completos de *Ternstroemia pringlei*, se obtuvieron 31 mg de un sólido de color blanco recristalizado con MeOH y hexano, con punto de fusión 243-245°C (no corregido). Rendimiento: 7.49% (de un total de 413.8 mg de extracto). Esta sustancia fue identificada como el ácido 3-epi-ursólico (I) por comparación de los datos de espectroscopia de IR (película), RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}-d_6$ ) y de espectrometría EM(IE) con los reportados para este triterpenoide (Mukherjee *et al.*, 1982; Jo *et al.*, 2005)

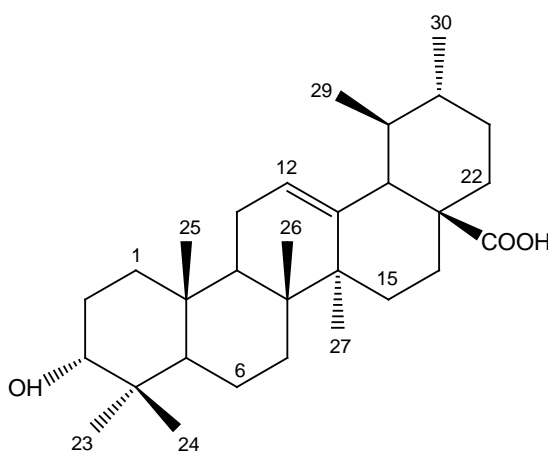


Figura 11. Ácido 3-epi-ursólico (I).

Asimismo, de la fracción 2 eluida con una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  (1:1), de la percolación del extracto metanólico del pericarpio de *Ternstroemia sylvatica*, fue detectada la presencia del ácido 3-epi-ursólico.

**IR (película)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3422, 2930, 1721, 1611, 1391, 1373, 1265, 1076, 1045.

**EM(IE)  $m/z$  (%):** 456 (1.77)  $[\text{M}]^+$ , 410(3.10)  $[\text{M} - \text{HCOOH}]^+$ , 300 (3.54), 248 (100), 207 (38.50), 203 (76.99)  $[\text{248} - \text{COOH}]^+$ , 189 (21.24)  $[\text{207} - \text{H}_2\text{O}]^+$ , 147 (12.39), 133 (52.65), 119 (19.47).

**RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}-d_6$ ):** 5.24 (*m*, 1H, 12-H), 3.18 (*t*, 1H,  $J = 7.8$  Hz, 3-H), 1.08 (*s*, 3H, Me-27), 0.98 (*s*, 3H, Me-25), 0.94 (*d*, 3H,  $J = 6$  Hz, Me-29), 0.92 (*s*, 3H, Me-24), 0.85 (*d*, 3H,  $J = 6.4$  Hz, Me-30), 0.83 (*s*, 3H, Me-23), 0.77 (*s*, 3H, Me-26).

### b) 28-O-[ $\beta$ -L-6-ramnopiranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol (II).

Con una muestra de 200 gramos de semillas de *Ternstroemia sylvatica* y 250 mL de agua, se preparó un extracto acuoso el cual se extrajo con n-butanol (2 L). Ambos extractos fueron concentrados a presión reducida, obteniendo 13.28 g (6.64%) de la fracción acuosa y 12.83 (6.42%) de la fracción n-butanólica. Una muestra de la fracción n-butanólica (10 g) se cromatografió usando Sephadex lipofílico LH-20 y eluída con metanol para obtener 20 fracciones de 500 mL. De la fracción 2, se obtuvo un precipitado de color blanco muy polar que revela para triterpenos con el reactivo de anisaldehído/ácido sulfúrico. Por medio de HPLC y EM-FAB (negativo), se observa que dicho precipitado es una mezcla de al menos 3 triterpenos glicosilados.

Una muestra de esta mezcla (20 mg) se hidrolizó con HCl 2N por 2.5 horas a reflujo y por 48 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se neutralizó con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10 % p/v en agua) y se obtuvo un precipitado blanco que fue identificado por EM(IE) y RMN<sup>1</sup>H como la aglicona R<sub>1</sub>-barrigenol (III), (Fu *et al.*, 2005). Otra muestra de la mezcla (20 mg) se hidrolizó por 2 horas a reflujo con HCl 2 N, la mezcla de reacción se neutralizó con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10 % p/v en agua) y se obtuvo un precipitado de color blanco-amarillento, con punto de fusión de 288-290°C, que fue identificado como 28-O-[ $\beta$ -L-6-ramnopiranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol (II), por sus propiedades espectroscópicas (1D y 2D) y espectrométricas. La identificación del carbohidrato se realizó secando a vacío el sobrenadante y tratándolo con 40  $\mu$ L de Sigma-Sil-A a 60°C por 10 minutos y analizando la mezcla de reacción por CG/EM, con estándares de carbohidratos tratados de manera similar.

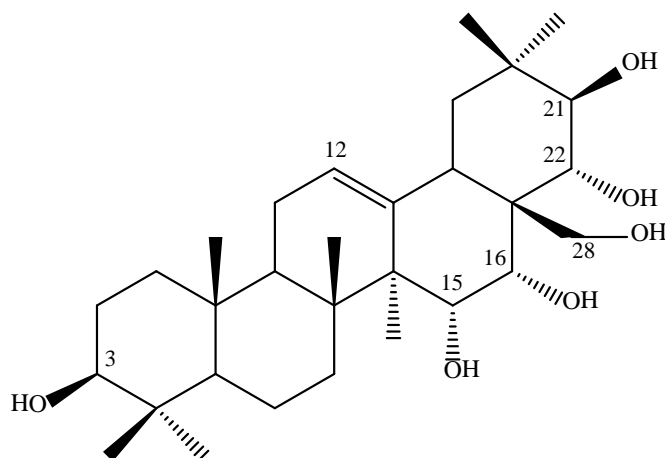


Figura 12. R<sub>1</sub>-barrigenol (III).

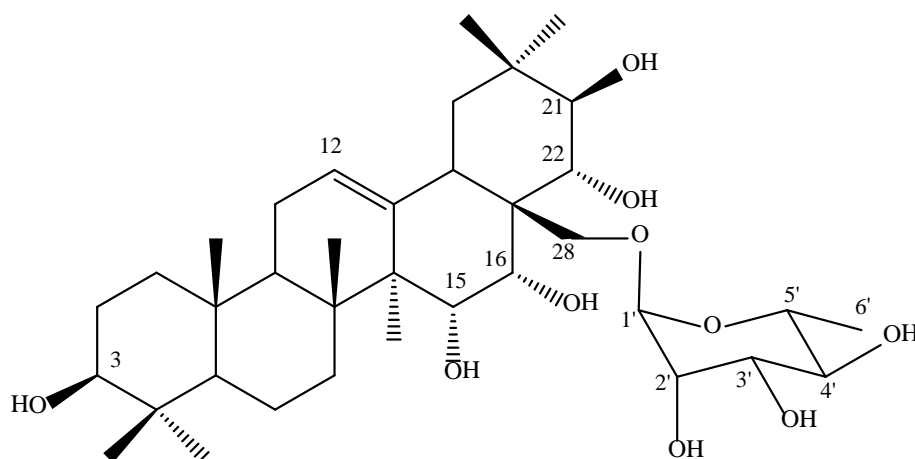


Figura 13. 28-O-[\beta-L-6-ramnopyranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol (II).

**EM-FAB (negativo) m/z:** 651 (M-H)<sup>-</sup>, 505 (M-H-Rha)<sup>-</sup>.

**RMN-<sup>13</sup>C (Py-d<sub>5</sub>, 100 MHz):**  $\delta$  47.92 (C-1), 41.57 (C-2), 78.13 (C-3), 39.41 (C-4), 55.72 (C-5), 19.22 (C-6), 36.9 (C-7), 42.11 (C-8), 39.36 (C-9), 37.53 (C-10), 24.14 (C-11), 124.58 (C-12), 144.86 (C-13), 54.58 (C-14), 67.51 (C-15), 72.48 (C-16), 48.21 (C-17), 47.51 (C-18), 47.58 (C-19), 36.52 (C-20), 78.45 (C-21), 77.2 (C-22), 16.74 (C-23), 17.72 (C-24), 16.06 (C-25), 28.82 (C-26), 21.19 (C-27), 72.28 (C-28), 30.71 (C-29), 19.54 (C-30), 102.79 (C-1'), 72.87 (C-2'), 73.96 (C-3'), 67.78 (C-4'), 69.69 (C-5'), 18.71 (C-6').

**RMN-<sup>1</sup>H (Py-d<sub>5</sub>, 400 MHz):**  $\delta$  1.48 (2H, *dd*, J=4, 12 Hz, 1-H), 2.82 (2H, *m*, 2-H), 3.06 (1H, *t*, J=12 Hz, 3-H), 0.97 (1H, *m*, 5-H), 1.66 (2H, *m*, 6-H), 2.17 (2H, *m*, 7-H), 1.89 (1H, *m*, 9-H), 1.98 (2H, *m*, 11-H), 5.55 (1H, *t*, J=4 Hz, 12-H), 4.46 (1H, *m*, 15-H), 4.98 (1H, *m*, 16-H), 1.84 (3H, *m*, 18-H, 19-H), 4.85 (1H, *d*, J=12 Hz, 21-H), 4.63 (1H, *d*, J=12 Hz, 22-H), 1.88 (3H, *s*, 23-H), 1.08 (3H, *s*, 24-H), 1.01 (3H, *s*, 25-H), 1.25 (3H, *s*, 26-H), 1.14 (3H, *s*, 27-H), 4.51 (2H, *m*, 28-H), 1.37 (3H, *s*, 29-H), 1.41 (3H, *s*, 30-H), 5.12 (1H, *d*, J=4 Hz, 1'-H), 4.44 (1H, *dd*, J=4, 8 Hz, 2'-H), 4.26 (1H, *t*, J=8 Hz, 3'-H), 4.13 (1H, *m*, 4'-H) 3.63 (1H, *m*, 5'-H), 1.64 (3H, *d*, J= 8 Hz, 6'-H).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Los porcentajes de rendimiento de cada uno de los extractos se muestran en el Cuadro 7.

**Cuadro 7. Extractos obtenidos, g (rendimiento)**

Extracto	<i>T. pringlei</i> (fruto completo)	<i>T. sylvatica</i>	
		pericarpio	semillas
Hexano	0.94 (0.21%)	1.44 (0.39%)	17.59 (31.30%)
Diclorometano	2.1 (0.47%)	2.01 (0.54%)	5.51 (9.81%)
Metanol	152.7 (34.46%)	50.17 (13.41%)	3.80 (6.76%)
Acuoso	1.54 (15.38%)	1.4 (13.99%)	1.42 (14.23%)

Cantidades originales (g) para los extractos orgánicos:  
*T. pringlei* 443.0 g  
*T. sylvatica* (pericarpio) 374.0 g  
*T. sylvatica* (semillas) 56.2 g  
 Para los extractos acuosos se pesaron 10 g de frutos, semillas o pericarpio.



*Ternstroemia pringlei*  
IZTA42169



*Ternstroemia sylvatica*  
IZTA42170

**Figura 14.** Fotografías de *T. pringlei* y *T. sylvatica*



## PARTE FARMACOLÓGICA

### a) Prueba del cilindro de exploración (*Exploratory Cylinder Test*).

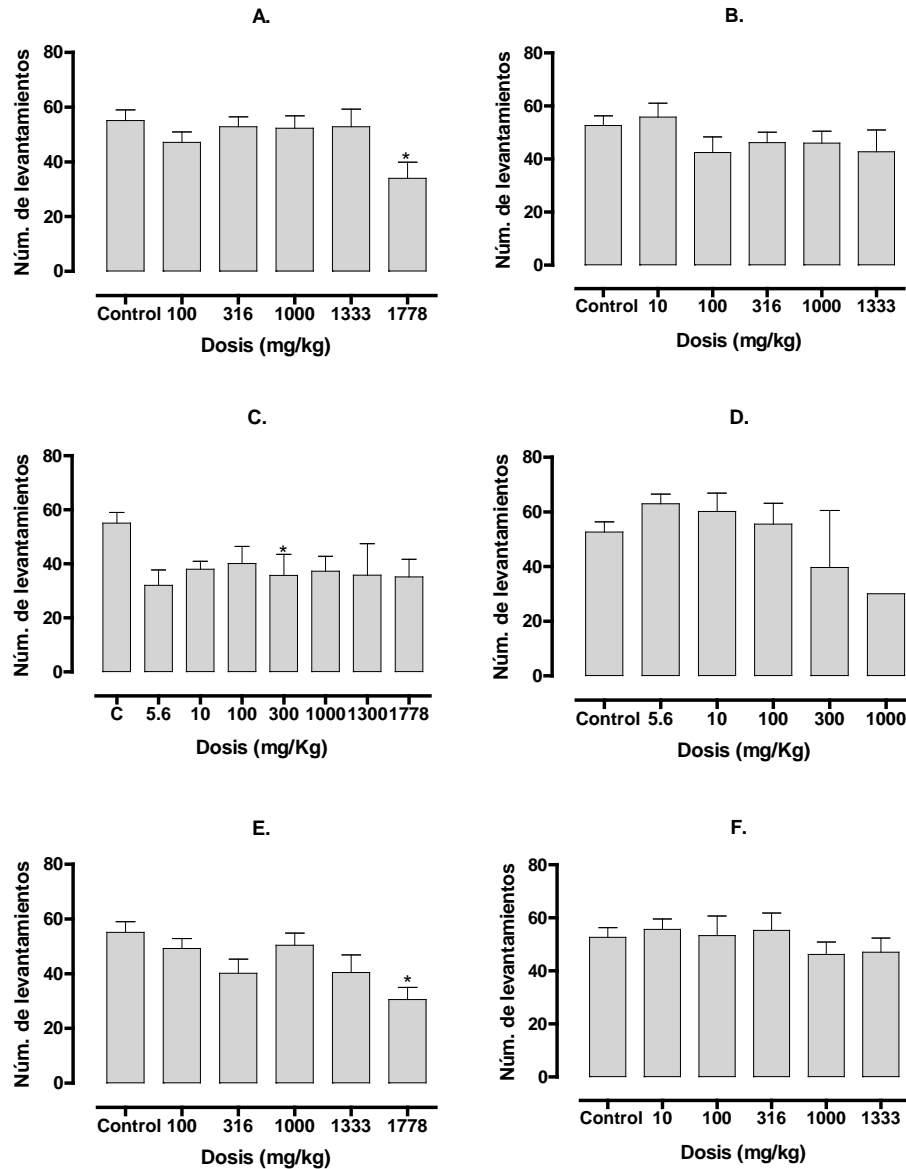
Se evaluaron en el cilindro de exploración. Los resultados de la evaluación de los extractos de *T. pringlei* y *T. sylvatica* para actividad sedante se muestran en el Cuadro 8. Se utilizó diacepam como fármaco de referencia.

<b>Cuadro 8. DE<sub>50</sub> sedante para los extractos de <i>T. pringlei</i> y <i>T. sylvatica</i> por vía i.p.</b>				
<b>PLANTA</b>	<b>PARTE</b>	<b>EXTRACTO</b>	<b>DE<sub>50</sub> ± eem (mg/kg)</b>	<b>MORTALIDAD*</b>
<b><i>T. pringlei</i></b>	Fruto completo	Hexano	446.7 ± 81.2	No
		Diclorometano	345.7 ± 140.5	No
		Metanol	232.9 ± 30.3	SÍ
		Acuoso	78.9 ± 17.2	SÍ
<b><i>T. sylvatica</i></b>	Pericarpio	Hexano	752.1 ± 208.4	No
		Diclorometano	743 ± 208.3	No
		Metanol	61.9 ± 6.4	SÍ
		Acuoso	41.5 ± 19.9	SÍ
	Semillas	Hexano	1270.1 ± 260.8	No
		Diclorometano	Sin efecto	No
		Metanol	13.8 ± 1.7	SÍ
		Acuoso	4.9 ± 0.8	SÍ
<b>Diacepam</b>			3.04 ± 1.14	

\* Todos o algunos animales murieron tiempo después de terminado el experimento.

Los resultados muestran que los extractos metanólicos y acuosos de *T. sylvatica* fueron los más activos, e inclusive el extracto acuoso de semillas tienen una actividad comparable a la del diacepam. Sin embargo, estos extractos y los extractos metanólico y acuoso de *T. pringlei*, presentaron muerte en los ratones utilizados después de 1-2 h de la administración, lo cual indica que los extractos tienen toxicidad por vía i.p. Por ello, se decidió determinar el efecto sedante por vía intragástrica y la determinación de las DL<sub>50</sub> para cada extracto metanólico y acuoso tanto por vía i.p. e intragástrica.

**Efecto sedante por vía intragástrica.** La administración de los extractos acuosos de *T. pringlei* por vía p.o. no muestran efecto sedante. Los extractos acuosos de *T. sylvatica* muestran un pequeño efecto no dosis-dependiente y la administración continua por 5 días (una dosis por día) del extracto acuoso de semillas muestra efecto sedante, no dosis-dependiente, a dosis mayores de 300 mg/kg, además de toxicidad (Figura 15, Cuadro A1 del Apéndice I). Esto nos indica que posiblemente los metabolitos que se encuentran en la planta no son bien absorbidos o sufren efecto de primer paso (biotransformación intestinal y hepática).



**Figura 15.** Efecto sedante por vía p.o. en una administración única de los extractos acuosos de *T. pringlei* (A), semillas (C) y pericarpio (E) de *T. sylvatica*, y efecto sedante después de una administración diaria por vía intragástrica por 5 días de los extractos acuosos de *T. pringlei* (B), semillas (D) y pericarpio (F) de *T. sylvatica*.

\*Diferencia estadística significativa,  $P < 0.05$ , con respecto al control, después de un ANOVA de una vía seguida por una prueba de Dunnett.

## b) Toxicidad aguda.

### *Vía intraperitoneal.*

Se determinó la toxicidad aguda de los extractos a una dosis única por vía i.p. y un periodo de observación de 14 días. Se utilizaron los grupos de ratones que se utilizaron en la determinación del efecto sedante en la prueba del cilindro de exploración.

Después de los 14 días de observación, los ratones que sobrevivieron, presentaron una pérdida de peso con respecto al grupo control. Asimismo los ratones que murieron entre el día 2 y el día 5, presentaron una disminución de hasta el 60 % de su peso con respecto a su peso inicial. No hubo muertes después de los 5 días. El examen *post mortem* a nivel macroscópico no mostraron deformaciones o daño en los órganos internos de los animales.

Las DL<sub>50</sub> calculadas en el estudio de toxicidad aguda se muestran en el Cuadro 9.

**Cuadro 9. DL<sub>50</sub> de los extractos administrados por vía i.p.**

PLANTA	EXTRACTOS	LD <sub>50</sub> ± eem (mg/kg)
<i>Ternstroemia pringlei</i>	Metanol	>> 2000
	Acuoso	300.0 ± 46.5
<i>Ternstroemia sylvatica</i> (pericarpio)	Metanol	365.9 ± 120.2
	Acuoso	380.4 ± 191.3
<i>Ternstroemia sylvatica</i> (semillas)	Metanol	3.8 ± 2.6
	Acuoso	5.0 ± 1.4

Como puede observarse, todos los extractos con excepción del extracto metanólico de *T. pringlei* presentaron toxicidad, además, la DL<sub>50</sub> del extracto metanólico de semillas de *T. sylvatica* es menor a su DE<sub>50</sub>, y en el extracto acuoso de las semillas es prácticamente el mismo. Cabe señalar que la actividad sedante se mide en 30 minutos, mientras que el efecto tóxico en un periodo de 14 días.

Un grupo independiente de ratones (n=6) se administraron con una dosis de 100 mg/kg del extracto acuoso de semillas de *T. sylvatica* presentaron las siguientes características de toxicidad antes de su muerte, la cual sucede en un periodo de 90-100 minutos después de la administración:

1. Piloerección.
2. Movimiento intestinal intenso.

3. Dificultad al respirar (jadeos).
4. Pérdida de la actividad exploratoria y estado de alerta.
5. Pérdida del reflejo de escape.
6. Pérdida del color de la piel en las extremidades y cola (palidez).
7. Pérdida de la micción y defecación al manejo.
8. Aumento de la frecuencia respiratoria.
9. Disminución de la temperatura corporal.
10. Disminución del consumo de alimento y agua (sólo en aquellos que sobreviven más de 12 h).
11. Muerte
12. Colapso de los pulmones y diafragma.
13. Extravasación en la cavidad peritoneal.
14. Retención urinaria (vejiga llena de orina)
15. Sangrado en la cavidad peritoneal.

Un grupo independiente de ratones (n=6) se administraron con una dosis de 316 mg/kg del extracto acuoso de semillas de *T. sylvatica* presentan las mismas características, sin embargo la muerte del ratón ocurre entre 30 y 40 minutos.

Algunas características mencionadas son semejantes a las presentadas por sustancias depresoras del SNC, inclusive la muerte de los animales parece deberse a una depresión respiratoria (el examen *post mortem* mostró daño en pulmones y diafragma) o a un sangrado interno (el examen *post mortem* mostró extravasación y sangrado en la cavidad peritoneal). Algunos signos observados en los ratones concuerdan con efectos agonistas de los receptores GABA<sub>A</sub> o moduladores de los mismos como lo hacen las benzodiazepinas o los barbitúricos (dificultad para respirar, pérdida de los reflejos de escape, sedación, hipotermia, etc.) asimismo, otros signos concuerdan con un efecto depresor provocado por antagonistas H<sub>1</sub> (extravasación, sedación) o por anticolinérgicos (retención urinaria, depresión respiratoria). Sin embargo, ninguno de estos mecanismos explica la totalidad de los efectos encontrados por lo que podría deberse a la acción de dos o más mecanismos simultáneamente.

De lo anterior, podemos generar dos hipótesis:

1. El efecto sedante observado y el efecto tóxico son el mismo, y por lo tanto los metabolitos contenidos en la planta son tóxicos.
2. Tanto el efecto sedante como el efecto tóxico son independientes, y son diferentes las sustancias presentes en la planta las que los generan.

Para comprobar o refutar cada una de las hipótesis se decidió realizar más pruebas de actividad en el sistema nervioso central, para encontrar una relación farmacológica entre ellas que nos indique que los efectos son independientes.

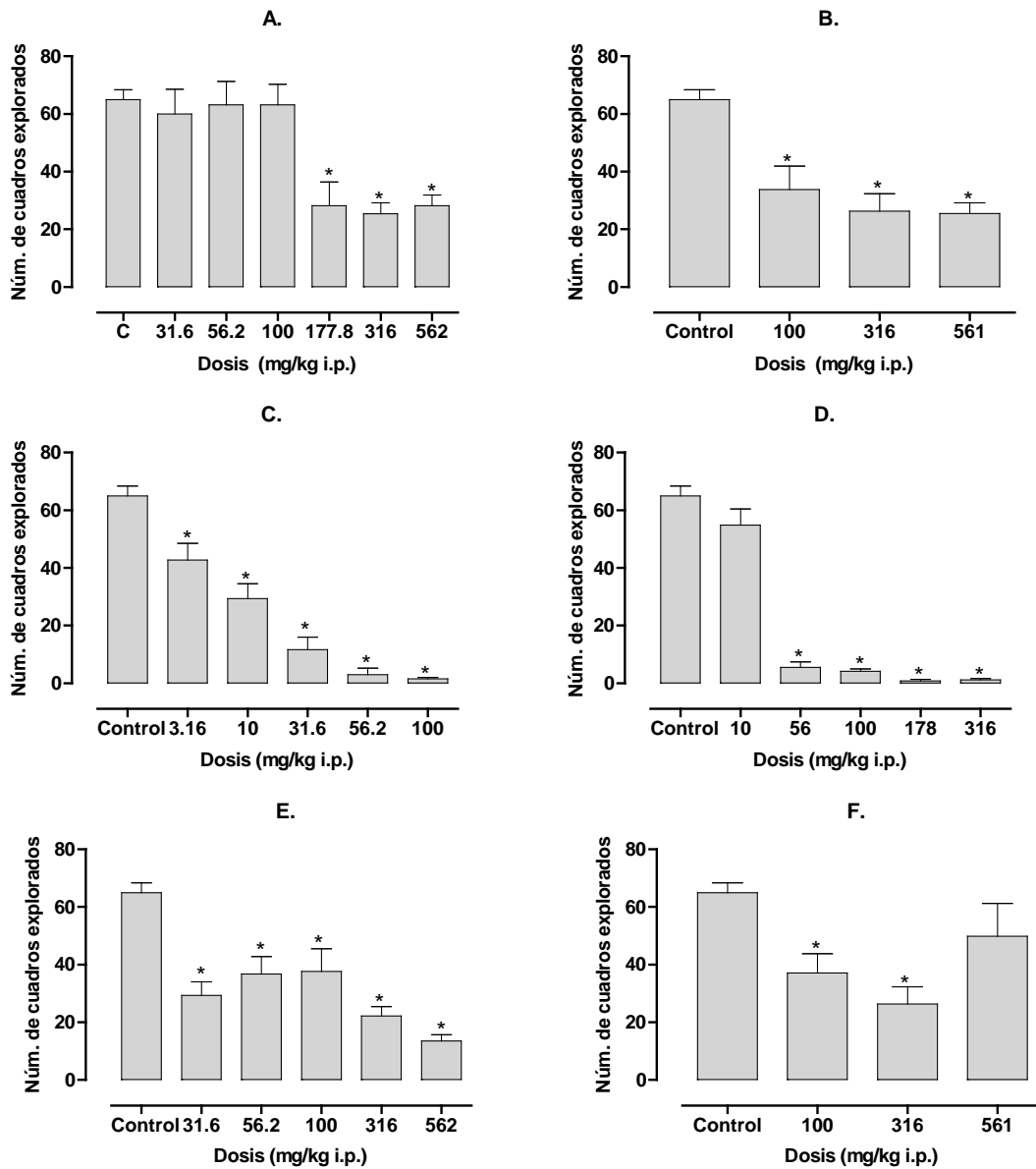
### **Vía intragástrica.**

Por vía intragástrica a una sola dosis, no se observa ningún signo de toxicidad en los ratones en un rango de dosis de 10 a 1333 mg/kg. Dosis más altas ya no se probaron. Este comportamiento indica que existe un componente importante farmacocinético a nivel de absorción que determina la toxicidad en los roedores.

### **c) Prueba de campo abierto (*Open Field Test*).**

En el Figura 16, se muestran las gráficas de los resultados de la prueba de campo abierto, donde se puede observar que todos los extractos ensayados tienen algún grado de actividad en la inhibición de la actividad motora: los extractos acuoso y metanólicos de *T. pringlei* tienen efecto a partir de una dosis establecida (177 y 100 mg/kg respectivamente) y de ahí se mantiene constante, por lo que no hay una relación dosis-respuesta. Los extractos acuosos de semillas y pericarpio de *T. sylvatica* presentan este mismo comportamiento no dependiente de la dosis, aunque el efecto es mayor en el acuoso, principalmente debido a que se presentan los efectos tóxicos en los ratones (Cuadro A2 del Apéndice I).

El extracto metanólico de las semillas de *T. sylvatica* mostró un comportamiento dosis-dependiente de la inhibición de la actividad motora, construyendo la curva dosis-respuesta correspondiente y realizando el ajuste al modelo del efecto máximo sigmoide, nos da un valor de  **$DE_{50} = 6.062 \pm 0.998 \text{ mg/kg}$** , sin embargo, los efectos tóxicos se presentaron en las mismas dosis en las cuales se ve un efecto.



**Figura 16.** Efecto sobre la actividad motora por vía i.p. en una administración única de los extractos metanólicos de *T. pringlei* (A), semillas (C) y pericarpio (E) de *T. sylvatica*, y de los extractos acuoso de *T. pringlei* (B), semillas (D) y pericarpio (F) de *T. sylvatica*. \*Diferencia estadística significativa,  $P < 0.05$ , con respecto al control, después de un ANOVA de una vía seguida por una prueba de Dunnett.

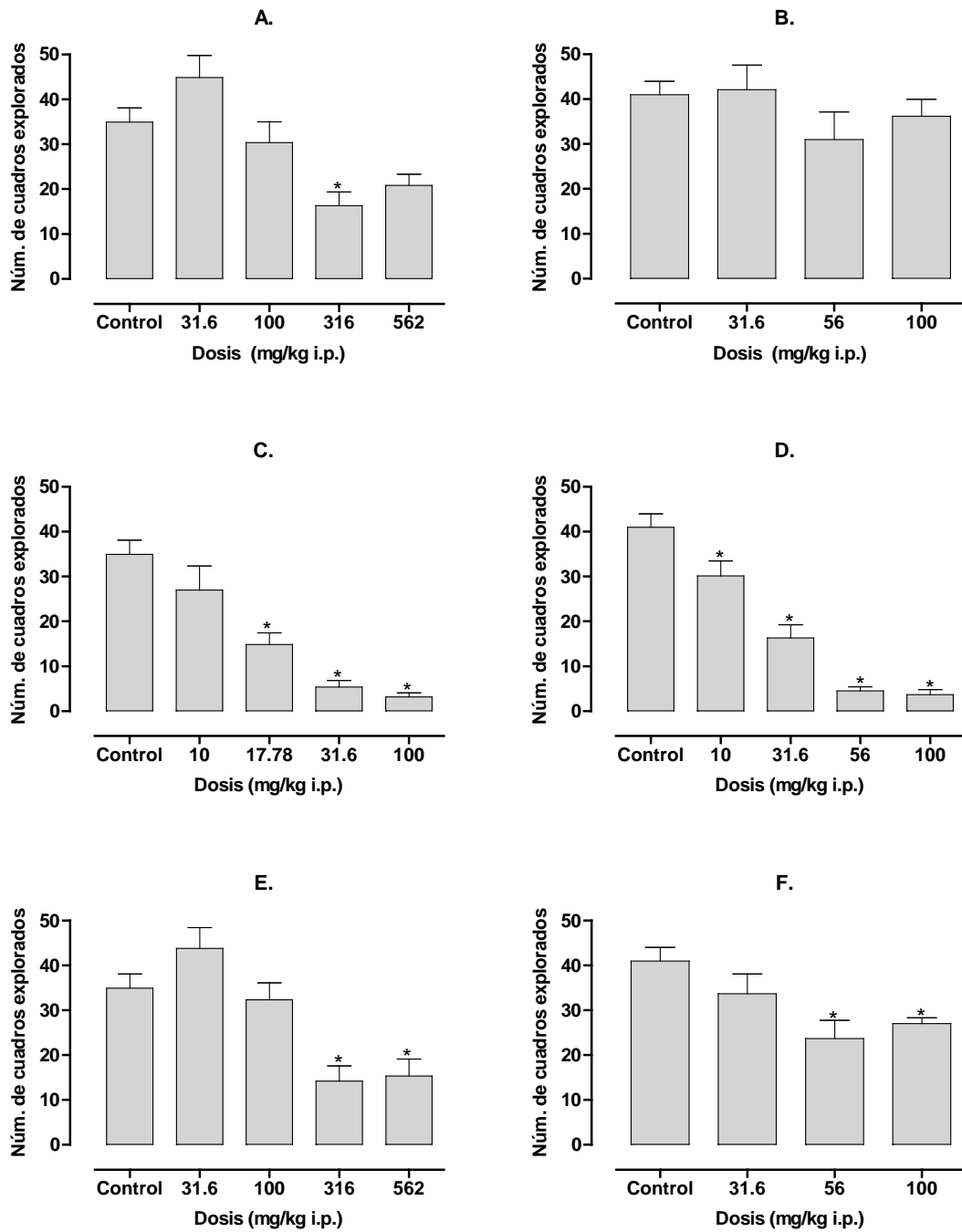
#### **d) Prueba del tablero de hoyos (*Hole Board Test*).**

La evaluación de los extractos mostraron que el extracto metanólico de *T. pringlei* tiene un efecto pequeño (menor al 50%) no dependiente de la dosis (Figura 17, Cuadro A4 del Apéndice I), mientras que su extracto acuoso no presenta efecto a las dosis probadas. Lo que significa que muy probablemente estos extractos no tengan efecto ansiolítico, lo que podría corroborarse aplicando otros experimentos para actividad ansiolítica como la prueba de nado forzado o la cruz elevada. Además, ya se había informado que a una dosis única no se encontró efecto ansiolítico en ratas (Molina, 1999).

Tanto el extracto metanólico y acuoso de las semillas de *T. sylvatica* indujeron efecto dependiente de la dosis con una  $DE_{50} = 10.75 \pm 1.98 \text{ mg/kg}$  para el extracto metanólico, y  $DE_{50} = 20.78 \pm 2.43 \text{ mg/kg}$  para el extracto acuoso. Sin embargo a las dosis altas se presentaron los signos de toxicidad en los animales.

Los extractos metanólico y acuoso del pericarpio de *T. sylvatica*, provocaron una disminución del número de hoyos explorados no dependiente de la dosis, aunque este menor al 50% y a dosis altas, por lo que podemos concluir la ausencia de efecto ansiolítico en los extractos.

En este experimento podemos concluir que se presentó el efecto en los extractos de las semillas de *T. sylvatica*, acompañado del efecto tóxico (mortalidad), por lo que no se descarta, hasta este momento, que sean el mismo efecto.



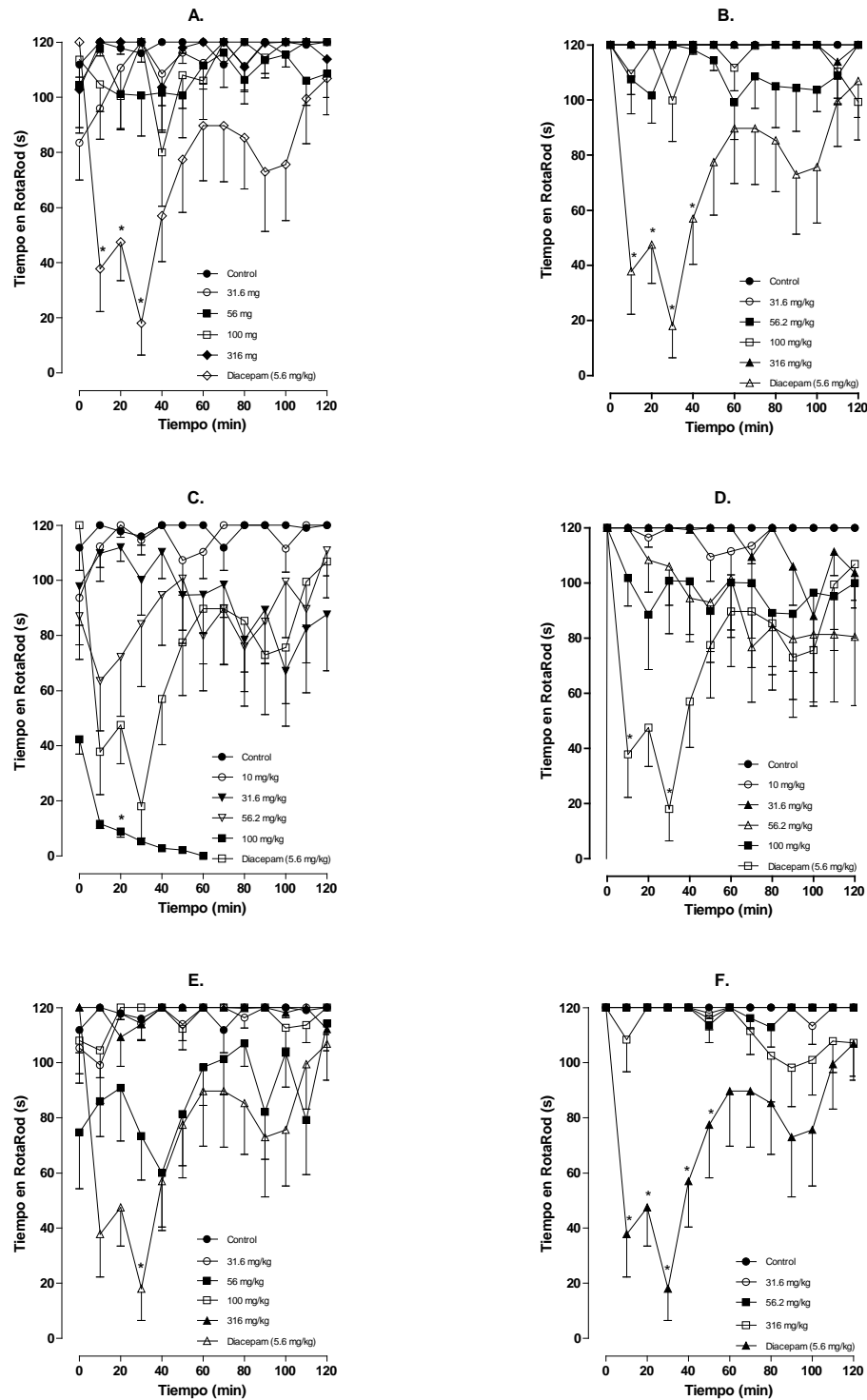
**Figura 17.** Efecto sobre la actividad ansiolítica en el tablero de hoyos por vía i.p. en una administración única de los extractos metanólicos de *T. pringlei* (A), semillas (C) y pericarpio (E) de *T. sylvatica*, y de los extractos acuosos de *T. pringlei* (B), semillas (D) y pericarpio (F) de *T. sylvatica*. \*Diferencia estadística significativa,  $P < 0.05$ , con respecto al control, después de un ANOVA de una vía seguida por una prueba de Dunnett.



### e) Prueba de coordinación motora en *Rota-Rod*.

En la evaluación de los extractos de *T. pringlei* sobre la coordinación motora nos indica que el extracto metanólico ejerce un pequeño efecto, sin embargo, no es dependiente de la dosis; mientras que en el extracto acuoso, sólo a dosis altas como 562 mg/kg se encuentra un efecto, aunque no importante. Lo anterior no concuerda con lo encontrado en la evaluación sedante, ya que este efecto siempre viene acompañado de una disminución de la coordinación motora, es decir, *T. pringlei* presenta efecto sedante sin pérdida de la coordinación motora (Figura 18).

Con respecto a la evaluación de los extractos de semilla de *T. sylvatica* se encontró que ambos extractos presentan efecto sobre la coordinación motora, pero sólo el extracto metanólico de semillas de *T. sylvatica*, el efecto fue dosis dependiente con un  $DE_{50} = 52.21 \pm 4.45 \text{ mg/kg}$ , y en ambos extractos en las concentraciones más altas hubo muerte de ratones, inclusive en el extracto metanólico no se completó la curva con las últimas concentraciones. Nuevamente observamos que el efecto que se evalúa se presenta sólo en conjunto con el efecto tóxico.

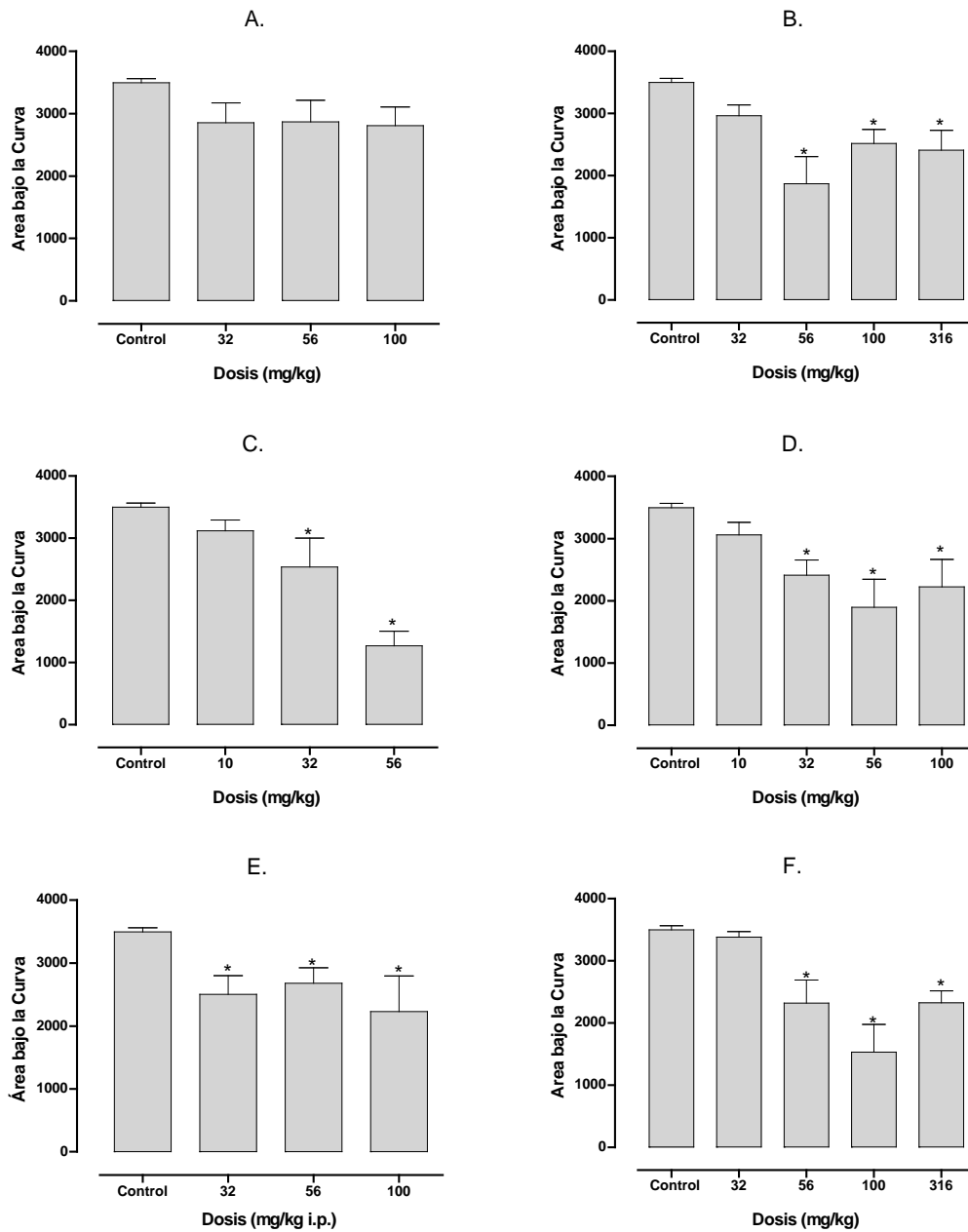


**Figura 18.** Efecto sobre la coordinación motora en Rota-Rod por vía i.p. en una administración única de los extractos metanólicos de *T. pringlei* (A), semillas (C) y pericarpio (E) de *T. sylvatica*, y de los extractos acuosos de *T. pringlei* (B), semillas (D) y pericarpio (F) de *T. sylvatica*. Diferencia estadística significativa,  $P < 0.05$ , con respecto al control, después de un ANOVA de una vía seguida por una prueba de Dunnett.

**f) Prueba sobre la función neuromuscular (*Grip Strenght*).**

El extracto metanólico de *T. pringlei* no provocó miorelajación, mientras que el extracto acuoso de la misma planta indujo un pequeño efecto no dependiente de la dosis, asimismo los extractos acuosos de semillas y de pericarpio, y el metanólico del pericarpio de *T. sylvatica* presentaron un efecto miorelajante de alrededor del 20-30%, sin embargo este efecto no fue dosis dependiente y en las dosis más altas probadas, los ratones presentaron los signos de toxicidad, ya anteriormente señalados (Figura 19).

El extracto metanólico de las semillas, fue el único extracto que presentó un efecto miorelajante bien definido y dependiente de la dosis, la dosis inhibitoria calculada por el modelo lineal-logarítmico fue  $DE_{50} = 45.39 \pm 5.85 \text{ mg/kg}$ . Cabe señalar que aunque este extracto presentó efecto miorelajante, los ratones también presentaron signos de toxicidad y en las dosis más altas hubo muerte de algunos ratones. Nuevamente observamos que al presentarse un efecto neurofarmacológico viene acompañado el efecto tóxico y en algunos casos sólo podemos ver el efecto tóxico como en el extracto acuoso de semillas.

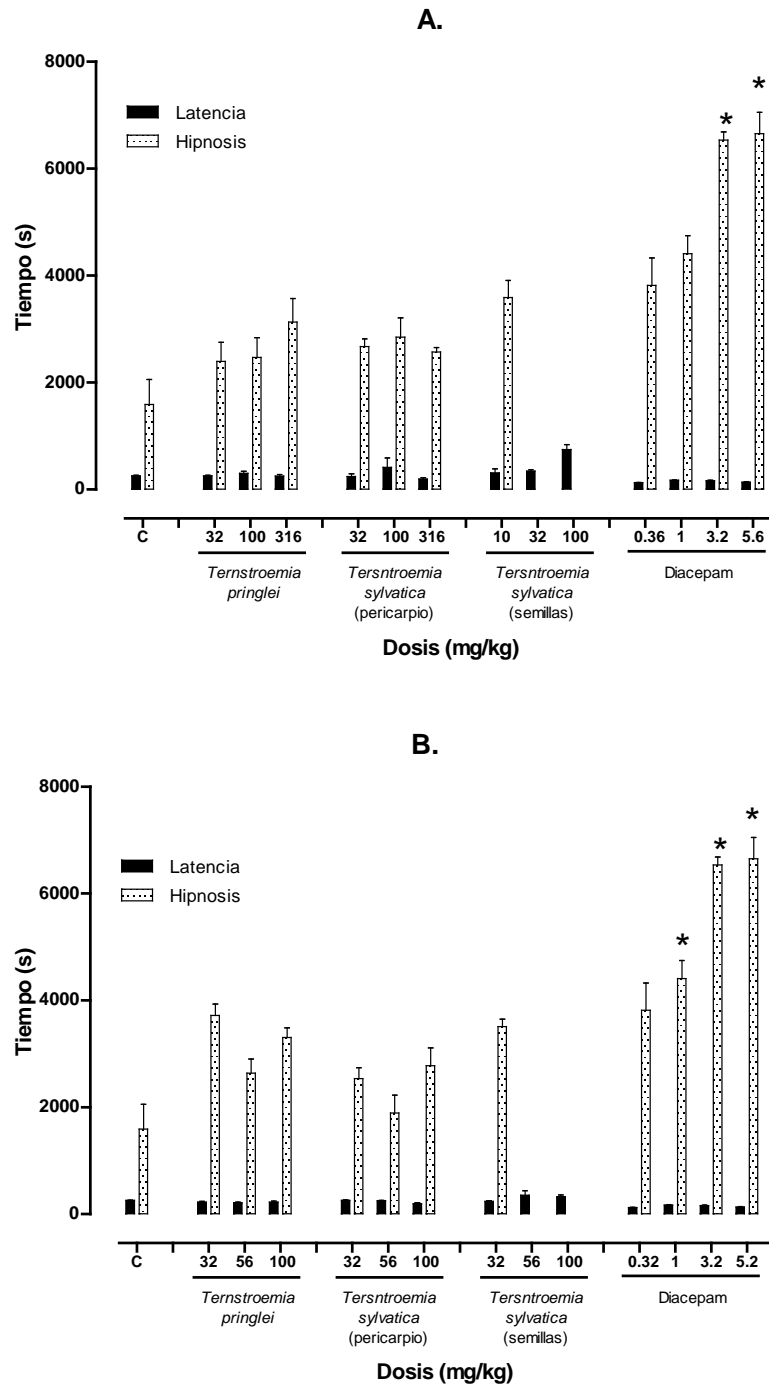


**Figura 19.** Efecto miorrelajante por vía i.p. en una administración única de los extractos metanólicos de *T. pringlei* (A), semillas (C) y pericarpio (E) de *T. sylvatica*, y de los extractos acuosos de *T. pringlei* (B), semillas (D) y pericarpio (F) de *T. sylvatica*. \*Diferencia estadística significativa,  $P < 0.05$ , con respecto al control, después de un ANOVA de una vía seguida por una prueba de Dunnett.

### **g) Potenciación de la hipnosis inducida por pentobarbital.**

Al administrar pentobarbital sódico a ratones previamente tratados con los extractos metanólicos y acuosos de *T. pringlei* y pericarpio de *T. sylvatica*, no se observa un cambio estadísticamente significativo en la latencia de inicio de la hipnosis, ni en la duración de la hipnosis misma, comparados con un grupo de ratones que fue previamente tratados sólo con disolución salina; por lo que se puede afirmar que estos extractos no potencializan el efecto del pentobarbital como se observa en grupos de ratones previamente tratados con diacepam (Figura 20, Cuadro A5 del Apéndice I). Lo anterior nos indica que posiblemente no hay efecto de estas plantas a nivel del SNC.

Sin embargo, a grupos previamente tratados con diferentes concentraciones del extracto metanólico y acuoso de semillas de *T. sylvatica*, que aunque no observa un cambio significativo en las latencias del efecto hipnótico, los ratones al caer en el efecto hipnótico, poco tiempo de después se presenta la muerte del mismo a partir de la dosis de 56 mg/kg (Figura 20). En este caso se observa no una potenciación del efecto hipnótico del pentobarbital, sino la potenciación del efecto tóxico de los extractos de semillas. Podemos suponer que el efecto tóxico ejercido por los extractos de semillas tienen un componente a nivel del SNC, es decir, parte o completamente efecto tóxico es a nivel del SNC (González-Trujano *et al.*, 2006).

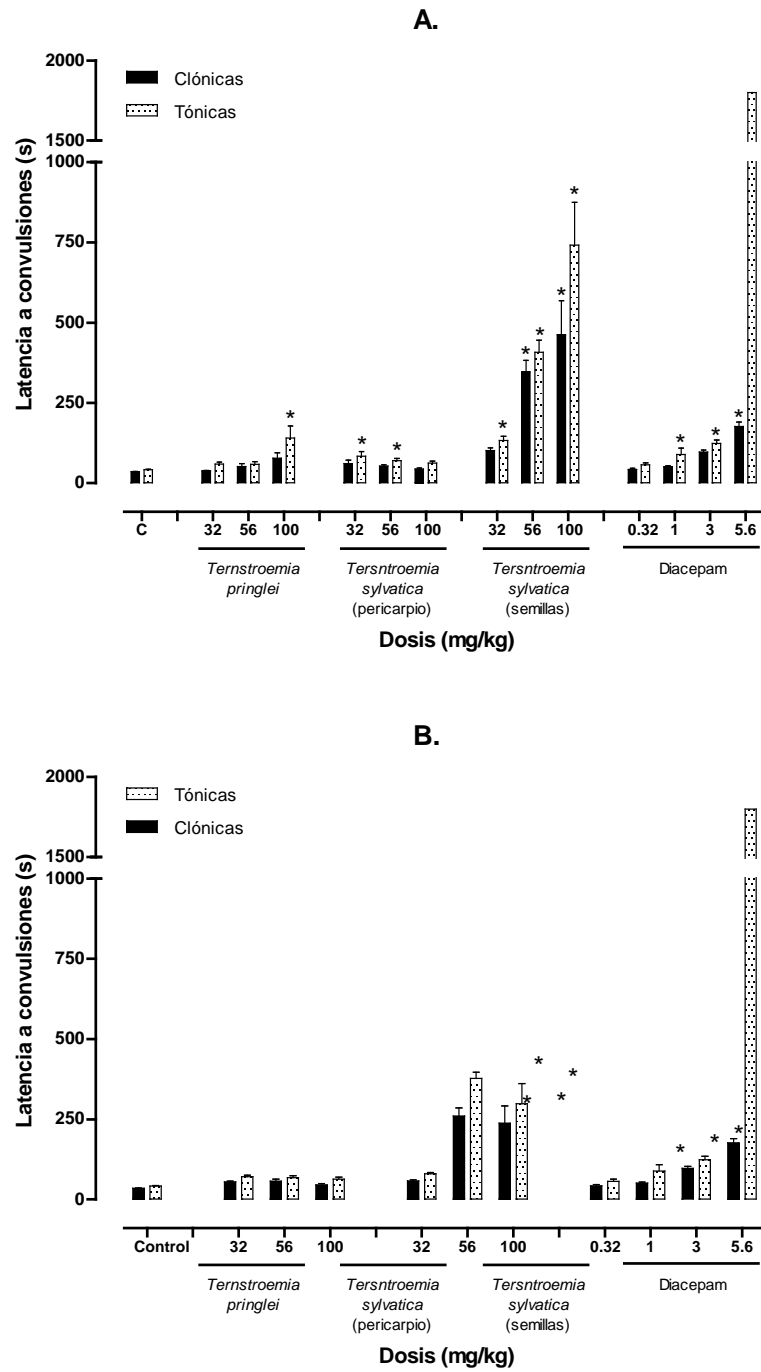


**Figura 20.** Efecto de la administración i.p. de los extractos metanólicos (A) y acuosos (B) de *T. pringlei*, *T. sylvatica* y diacepam, en la latencia y duración de la hipnosis del pentobarbital sódico. \*Diferencia estadística significativa,  $P < 0.05$ , con respecto al control, después de un ANOVA de una vía seguida por una prueba de Dunnett.

#### **h) Inhibición de las convulsiones inducidas por pentilentetrazol.**

Al administrar pentilentetrazol (PTZ) a ratones previamente tratados con los extractos acuosos de *T. pringlei* y pericarpio de *T. sylvatica*, no mostraron efecto sobre la latencia de aparición de las convulsiones clónicas y tónicas, con respecto al grupo tratado sólo con disolución salina, ni tampoco hubo efecto protector (todos los animales murieron por el efecto del PTZ). Los extractos metanólicos de *T. pringlei* y pericarpio de *T. sylvatica* mostraron un aumento en la latencia de las convulsiones tónicas, sin embargo este efecto no es significativo y no dependiente de la dosis (Figura 21, Cuadro A3 del Apéndice I), además de que no protegen a los ratones (González-Trujano *et al.*, 2006).

Los extractos metanólico y acuoso de las semillas de *T. sylvatica*, presentaron un aumento en la latencia de las convulsiones tanto clónicas como tónicas y en el caso del extracto metanólico, de manera dependiente de la dosis. Sin embargo, en ningún caso iguala la actividad del diacepam ni su función protectora presentada a la dosis de 5.6 mg/kg. Con estos datos podemos observar que el efecto depresor ejercido por los extractos no es suficiente para detener la acción del PTZ, por lo que el mecanismo de la depresión ejercida por los extractos, y por lo tanto su acción tóxica, puede ser diferente a la del diacepam.



**Figura 21.** Efecto anticonvulsivante de los extractos metanólicos (A) y acuosos (B) de *T. pringlei*, *T. sylvatica* y diacepam, administrados por vía i.p. \*Diferencia estadística significativa,  $P < 0.05$ , con respecto al control, después de un ANOVA de una vía seguida por una prueba de Dunnett.



## **i) Efecto sobre los parámetros hematológicos.**

Con respecto al efecto de los extractos en los parámetros hematológicos, este se realizó en ratas debido a que los efectos mostrados en ratones también se presentan en las ratas con la ventaja de tener un volumen sanguíneo mayor para las tomas de muestra. Se escogió el extracto acuoso para la evaluación, y se manipularon dos variables: el tiempo desde la administración del extracto y la concentración del mismo. Los límites para el tiempo y la dosis fueron de 90 minutos y 316 mg/kg, ya que a partir de un tiempo mayor de 90 minutos o una dosis mayor a 316 mg/kg, el animal muere rápidamente.

El extracto acuoso de las semillas de *T. sylvatica* disminuye significativamente el número de plaquetas (con respecto al control que recibió sólo el vehículo). La trombocitopenia inducida por este extracto resultó ser dosis- y tiempo- dependiente, y los valores del conteo de plaquetas llegaron hasta una disminución del 90% en 90 minutos a una dosis de 100 mg/kg: una disminución muy grande de plaquetas en un tiempo relativamente corto (Cuadro 10, Figura 21 y Cuadros A6, A7 y A8 del Apéndice I).

Este mismo efecto de disminución del valor, no fue observado en ningún otro parámetro hematológico o por lo menos no de manera estadísticamente significativa.

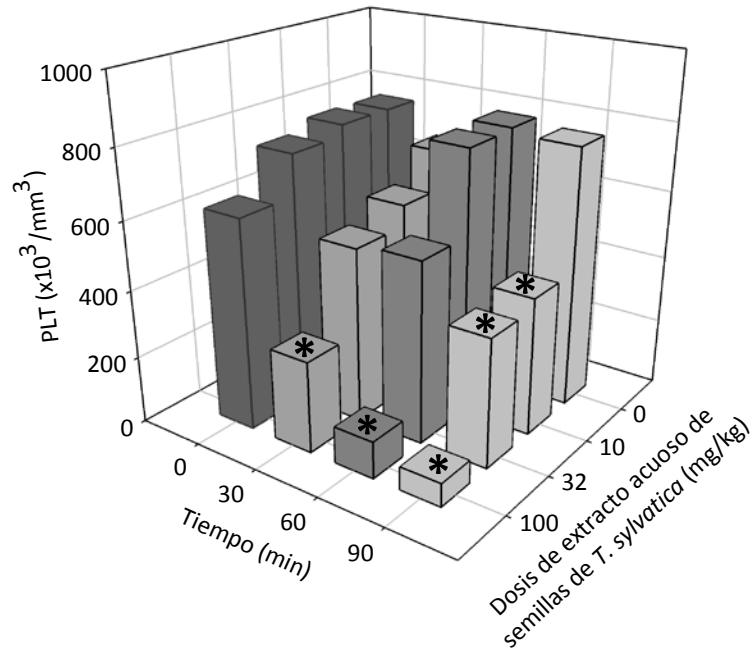
El efecto trombocitopénico es importante debido a que no hay sustancias conocidas que produzcan el efecto en un tiempo tan corto como el extracto. Generalmente la trombocitopenia es un efecto adverso de diversos fármacos como la rifampicina (Lee y Lee, 1989), algunos antiepilépticos como la oxcarbacepina (Mahmud *et al.*, 2006), fenobarbital (Knutsen *et al.*, 1984), fenitoína (Tennis *et al.*, 1997) o el ácido valproico (Tichy *et al.*, 2003), el inhibidores de la recaptura de serotonina como la fluoxetina, paroxetina y sertralina (ADRAC, 1998; Calhoun y Calhoun, 1996) y el antimalárico quinina (George y Aster, 2009). Y como efecto adverso, este aparece después de varios días o incluso semanas de tratamiento con el fármaco, a una frecuencia del 18 al 30% de los pacientes, asimismo, estos se recuperan al retirarse el fármaco. Además, aún no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual se produce este efecto, aunque se piensa que existe supresión de la médula ósea (ADRAC, 1998; George y Aster, 2009).

La trombocitopenia inducida por plantas medicinales también ha sido reportada: Jui, una medicina herbolaria china, la cual está compuesta por la mezcla de *Sinomeni caulis* et rhizoma, *Glycyrrhizae radix*, *Aralia elata*, *Glechomae herba*, y *Taxus cuspidate* induce aguda y reversiblemente la trombocitopenia (Azuno *et al.*, 1999; Ohmori *et al.*, 2004). No se conocen aún las causas de la trombocitopenia producida por dichas plantas.

**Cuadro 10.** Parámetros hematológicos determinados después de la administración del extracto acuoso de semillas de *T. sylvatica*.

Tiempo	Planta	Parámetro	Dosis (mg/kg)			
			Vehículo	10	32	100
0 minutos	<i>Ternstroemia pringlei</i>	Glóbulos Rojos, RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	7.92 ± 0.42	6.98 ± 0.33	7.32 ± 0.3	6.84 ± 0.6
		Hemoglobina, HGB (g/dl)	15.18 ± 0.53	14.17 ± 0.45	14.6 ± 0.47	13.74 ± 1.39
		Hematocrito, HCT (%)	47.9 ± 1.46	44.43 ± 2.12	45.43 ± 1.55	42.18 ± 4.03
		Plaquetas, PLT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	771.25 ± 42.36	794.67 ± 128.36	818.5 ± 38.09	506.6 ± 187.34
	<i>Ternstroemia sylvatica</i> (pericarpio)	Glóbulos Rojos, RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	7.92 ± 0.42	6.92 ± 0.22	7.38 ± 0.17	7.23 ± 0.3
		Hemoglobina, HGB (g/dl)	15.18 ± 0.53	13.76 ± 0.27	14.86 ± 0.31	14.6 ± 0.71
		Hematocrito, HCT (%)	47.9 ± 1.46	42.96 ± 1.15	44.98 ± 0.98	43.8 ± 2.22
		Plaquetas, PLT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	771.25 ± 42.36	549.6 ± 137.14	738.6 ± 53.85	816.25 ± 90.61
	<i>Ternstroemia sylvatica</i> (semillas)	Glóbulos Rojos, RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	7.92 ± 0.42	7.14 ± 0.13	7.51 ± 0.27	7.27 ± 0.18
		Hemoglobina, HGB (g/dl)	15.18 ± 0.53	14.7 ± 0.23	13.2 ± 1.76	14.56 ± 0.39
		Hematocrito, HCT (%)	47.9 ± 1.46	45.68 ± 0.8	45.63 ± 0.95	44.12 ± 1.2
		Plaquetas, PLT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	771.25 ± 42.36	773.8 ± 42.58	742.33 ± 93.81	623.4 ± 155.42
30 minutos	<i>Ternstroemia pringlei</i>	Glóbulos Rojos, RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	6.72 ± 0.25	6.52 ± 0.15	6.69 ± 0.29	5.66 ± 0.54
		Hemoglobina, HGB (g/dl)	13.16 ± 0.48	12.97 ± 0.41	13.92 ± 0.37	11.54 ± 1.01
		Hematocrito, HCT (%)	40.32 ± 1.95	39.93 ± 0.9	43.28 ± 1.3	34.64 ± 3.67
		Plaquetas, PLT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	428.6 ± 153.99	711.33 ± 107.16	515 ± 184.18	193.6 ± 99.13
	<i>Ternstroemia sylvatica</i> (pericarpio)	Glóbulos Rojos, RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	6.72 ± 0.25	6.31 ± 0.35	6.96 ± 0.52	6.2 ± 0.6
		Hemoglobina, HGB (g/dl)	13.16 ± 0.48	12.58 ± 0.65	13.56 ± 0.73	12.48 ± 1.02
		Hematocrito, HCT (%)	40.32 ± 1.95	39.43 ± 1.78	41.78 ± 2.41	37.8 ± 3.87
		Plaquetas, PLT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	428.6 ± 153.99	671.75 ± 88.17	458.8 ± 163.98	350 ± 201.89
	<i>Ternstroemia sylvatica</i> (semillas)	Glóbulos Rojos, RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	6.72 ± 0.25	6.9 ± 0.46	7.54 ± 0.21	6.68 ± 0.57
		Hemoglobina, HGB (g/dl)	13.16 ± 0.48	14.18 ± 0.74	14.7 ± 0.43	13.48 ± 0.94
		Hematocrito, HCT (%)	40.32 ± 1.95	43.73 ± 2.59	45.68 ± 1.77	40.3 ± 3.06
		Plaquetas, PLT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	428.6 ± 153.99	579.5 ± 177.81	519.6 ± 208.21	272 ± 214.36
60 minutos	<i>Ternstroemia pringlei</i>	Glóbulos Rojos, RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	6.92 ± 0.46	5.52 ± 0.67	6.13 ± 0.31	7.01 ± 0.45
		Hemoglobina, HGB (g/dl)	13.44 ± 0.7	10.98 ± 1.08	12.7 ± 0.62	11.5 ± 1.22
		Hematocrito, HCT (%)	41.16 ± 1.94	34.18 ± 3.73	39.4 ± 2.18	42.23 ± 3.69
		Plaquetas, PLT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	498.6 ± 181.87	234.25 ± 126.86	315.25 ± 186.52	302.33 ± 253.55
	<i>Ternstroemia sylvatica</i> (pericarpio)	Glóbulos Rojos, RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	6.92 ± 0.46	6.55 ± 0.73	5.53 ± 0.36	5.93 ± 0.43
		Hemoglobina, HGB (g/dl)	13.44 ± 0.7	12.9 ± 1.31	10.87 ± 0.29	11.83 ± 0.66
		Hematocrito, HCT (%)	41.16 ± 1.94	40.68 ± 4.42	32.57 ± 1.16	36.28 ± 1.84
		Plaquetas, PLT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	498.6 ± 181.87	285.2 ± 169.1	168.33 ± 145.86	424.25 ± 194.01
	<i>Ternstroemia sylvatica</i> (semillas)	Glóbulos Rojos, RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	6.92 ± 0.46	7.15 ± 0.62	7.1 ± 0.4	7.36 ± 0.55
		Hemoglobina, HGB (g/dl)	13.44 ± 0.7	14.6 ± 1.07	14.7 ± 0.72	13.6 ± 0.65
		Hematocrito, HCT (%)	41.16 ± 1.94	45.4 ± 3.99	45.97 ± 2.44	41 ± 1.99
		Plaquetas, PLT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	498.6 ± 181.87	782.25 ± 30.82	537.67 ± 439.48	109.75 ± 49.68
90 minutos	<i>Ternstroemia pringlei</i>	Glóbulos Rojos, RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	6.14 ± 0.61	5.8 ± 0.56	5.59 ± 0.42	6.54 ± 0.43
		Hemoglobina, HGB (g/dl)	12.25 ± 0.95	11.44 ± 0.9	11.84 ± 0.68	10.33 ± 1.97
		Hematocrito, HCT (%)	38.35 ± 2.75	36.22 ± 3.37	36.3 ± 2.3	40.27 ± 3.22
		Plaquetas, PLT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	411 ± 340	354 ± 173.52	316.8 ± 155.59	319.67 ± 242.13
	<i>Ternstroemia sylvatica</i> (pericarpio)	Glóbulos Rojos, RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	6.14 ± 0.61	6.02 ± 0.73	6.06 ± 0.31	5.54 ± 0.55
		Hemoglobina, HGB (g/dl)	12.25 ± 0.95	11.83 ± 1.36	12.23 ± 0.55	11.4 ± 0.67
		Hematocrito, HCT (%)	38.35 ± 2.75	37.53 ± 4.57	37.03 ± 1.3	34.33 ± 1.77
		Plaquetas, PLT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	411 ± 340	199.5 ± 160.12	242 ± 187.36	231.33 ± 180.87
	<i>Ternstroemia sylvatica</i> (semillas)	Glóbulos Rojos, RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	6.14 ± 0.61	6.64 ± 0.64	7.7 ± 0.52	7.13 ± 0.31
		Hemoglobina, HGB (g/dl)	12.25 ± 0.95	13.53 ± 1.2	15.27 ± 1.47	14.13 ± 0.75
		Hematocrito, HCT (%)	38.35 ± 2.75	41.83 ± 4.17	47.47 ± 4.77	43.17 ± 1.93
		Plaquetas, PLT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	411 ± 340	410.75 ± 181.4	381.33 ± 196.88	69.33 ± 26.27

Con estos datos, podemos concluir que el extracto acuoso de las semillas de *T. sylvatica* presenta un efecto tóxico caracterizado, entre otros efectos como la depresión del SNC, por una trombocitopenia aguda. Aunque estos resultados no se pueden extrapolar a los seres humanos, se requiere de más estudios de toxicidad y del mecanismo de acción por el cual se ejerce.

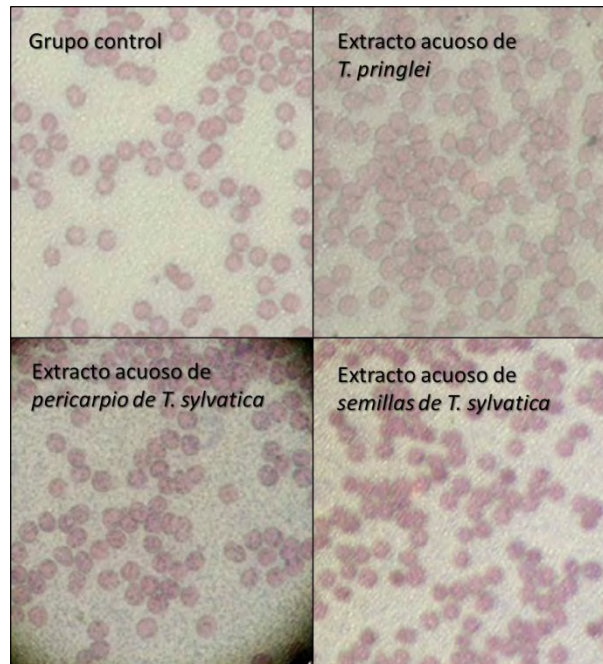


**Figura 21.** Efecto de la administración del extracto acuoso de las semillas de *T. sylvatica* en el conteo de plaquetas (PLT). Las barras representan el promedio de al menos 6 animales. \* P<0.05 diferencia estadísticamente significativa con respecto al vehículo después de un ANOVA de dos vía seguida por la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.

### I.1) Evaluación microscópica de los eritrocitos

De acuerdo con los datos anteriores, se decidió realizar frotis de muestras de sangre de ratas que fueron previamente administradas (90 min) con dosis de 100 mg/kg de los extractos acuosos de las plantas para averiguar si existían cambios en los eritrocitos. Los frotis se tiñeron mediante la tinción de Wright y se observaron al microscopio a un aumento de 40x (Figura 22).

Los resultados indican que no se encontraron cambios en la forma, color, o tamaño de los glóbulos rojos, comparados con una muestra control. Cabe señalar, que ha reportado que existen saponinas que alteran morfológicamente los eritrocitos y en algunos casos los hemolizan provocando una disminución del conteo de los mismos (Santos *et al.*, 1997), sin embargo, estos dos efectos no los provocan los extractos de las plantas estudiadas.

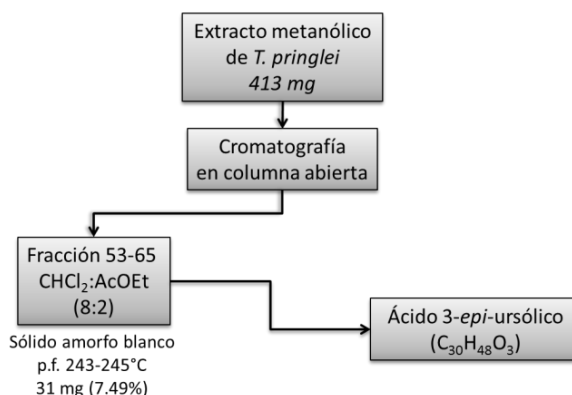


**Figura 22.** Frotis de muestras de sangre de ratas administradas con una dosis de 100 mg/kg de los extractos acuosos de las plantas después de 90 minutos. Los frotis se tiñeron mediante la tinción de Wright y se observaron a un aumento de 40x.

## PARTE QUÍMICA

### a) Ácido 3-*epi*-ursólico.

El extracto metanólico del fruto completo de *Ternstroemia pringlei*, se tomó una muestra de 413 mg y se le realizó una cromatografía abierta. De las fracciones 53-65 eluidas con una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$  (8:2), se obtuvieron 31 mg de un sólido de color blanco que fue purificado por recristalización con MeOH y hexano. Su punto de fusión no corregido fue de 243-245°C con rendimiento del 7.49% (Figura 23).



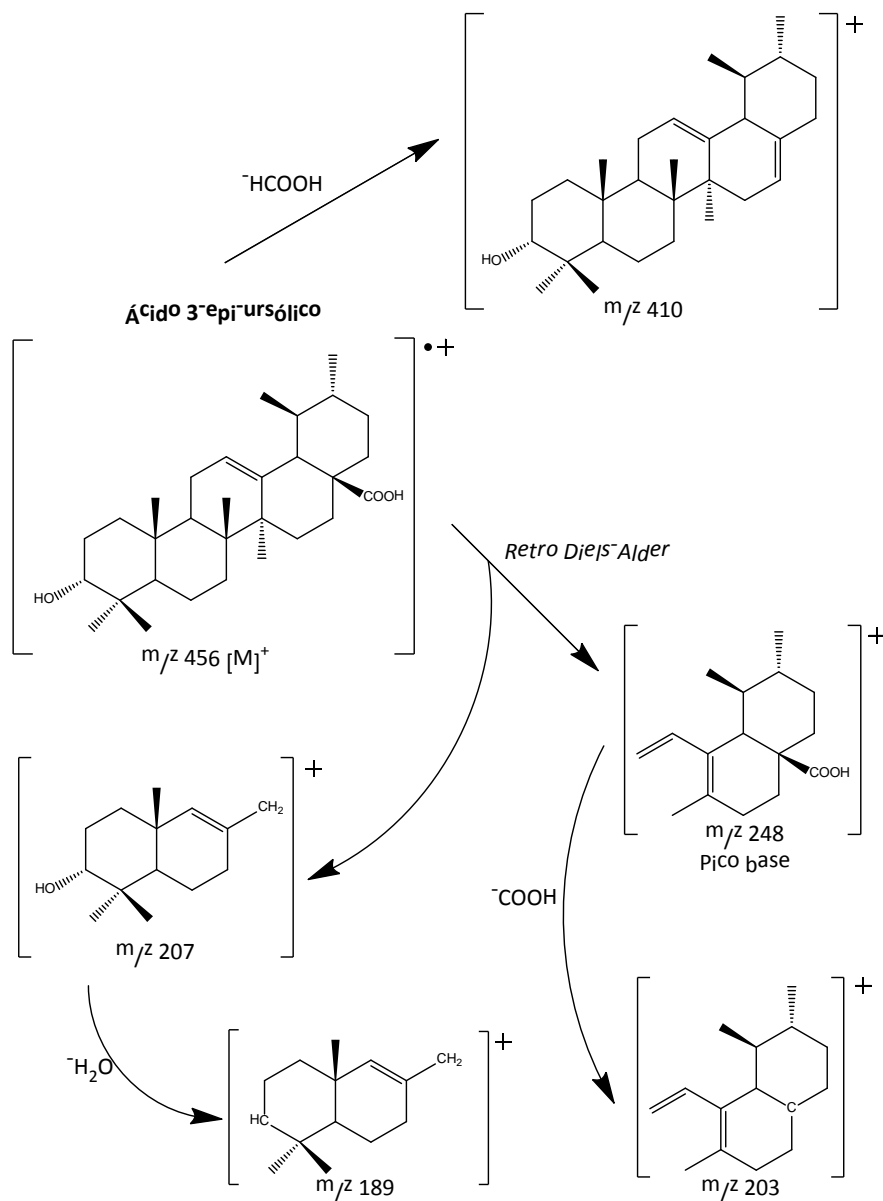
**Figura 23.** Esquema de aislamiento del ácido 3-*epi*-ursólico.

La sustancia en cuestión presenta en el espectro de IR (Apéndice 2, espectro 1) una banda de absorción en  $3422\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a un grupo hidroxilo, así como una banda a  $1721\text{ cm}^{-1}$  característica de un grupo carbonilo y una banda a  $1611\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a un doble enlace.

En su espectro de masas por impacto electrónico (Apéndice 2, espectro 2), EM(IE), se observa el ión molecular a un  $m/z$  de 456, para una fórmula molecular de  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ , además se observan los fragmentos a  $m/z$  248 y  $m/z$  207, características de un rompimiento por una reacción retro Diels-Alder de triterpenoide de tipo oleanano o ursano (Mukherjee, *et al.*, 1982). Los fragmentos en  $m/z$  410  $[\text{M}-\text{HCOOH}]^+$  y  $m/z$  203  $[\text{248}-\text{COOH}]^+$  indican la presencia de un grupo carboxilo en los anillos C\*DE, mientras que el fragmento  $m/z$  199  $[\text{207}-\text{H}_2\text{O}]^+$  indican la presencia de un hidroxilo en los anillos ABC\* (Figura 24).

En su espectro de RMN<sup>1</sup>H, se observan 5 singuletes correspondientes a 5 metilos terciarios a  $\delta$  1.08 (s, 3H, Me-27),  $\delta$  0.98 (s, 3H, Me-25),  $\delta$  0.92 (s, 3H, Me-24),  $\delta$  0.83 (s, 3H, Me-23),  $\delta$  0.77 (s, 3H, Me-26); y 2 señales dobles correspondientes a 2 metilos secundarios a  $\delta$  0.94 (d, 3H, J = 6 Hz, Me-29),  $\delta$  0.85 (d, 3H, J = 6.4 Hz, Me-30). Asimismo, se observa una señal múltiple a  $\delta$  5.24 (m, 1H, H<sub>12</sub>) correspondiente a un doble enlace endocíclico. Estos datos, nos indican que la sustancia tiene un esqueleto pentacíclico del tipo urs-12-eno, es decir un esqueleto de ursano con un doble

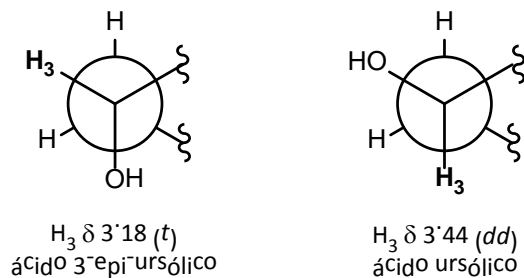
enlace en C<sub>12</sub>, un carboxilo en C<sub>28</sub> y un hidroxilo en el anillo A, estructura semejante a la del ácido ursólico (Mukherjee *et al.*, 1982; Seebacher *et al.*, 2003; Smati *et al.*, 2007).



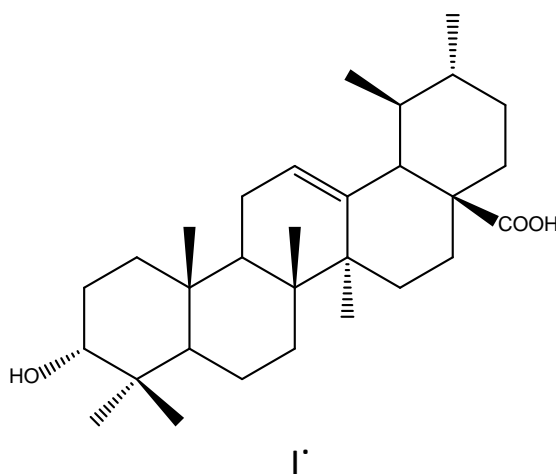
**Figura 24.** Patrón de fragmentación del ácido 3-epi-ursólico

Comparando los datos informados para el ácido ursólico y la sustancia en cuestión; se observa en la sustancia aislada a  $\delta$  3.18 (*t*, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-3) una señal triple que se asigna al hidrógeno base del hidroxilo de la posición 3 del anillo A. En el ácido ursólico esta señal se encuentra a un desplazamiento químico de  $\delta$  3.44 con una multiplicidad *doble de doble* (*dd*) y es asignada a un hidrógeno en configuración  $\alpha$  y por lo tanto, el hidroxilo del C-3 es un hidroxilo  $\beta$  (Figura 25). Por lo que se puede entonces concluir que en la sustancia en discusión, el hidrógeno de la posición 3 tienen una configuración  $\beta$  y el hidroxilo una configuración  $\alpha$ , lo cual corresponde al epímero del

ácido ursólico, el ácido 3-epi-ursólico (I); afirmación corroborada comparando los datos del ácido 3-epi-ursólico con los informados en la literatura (Youngmi *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 1982)



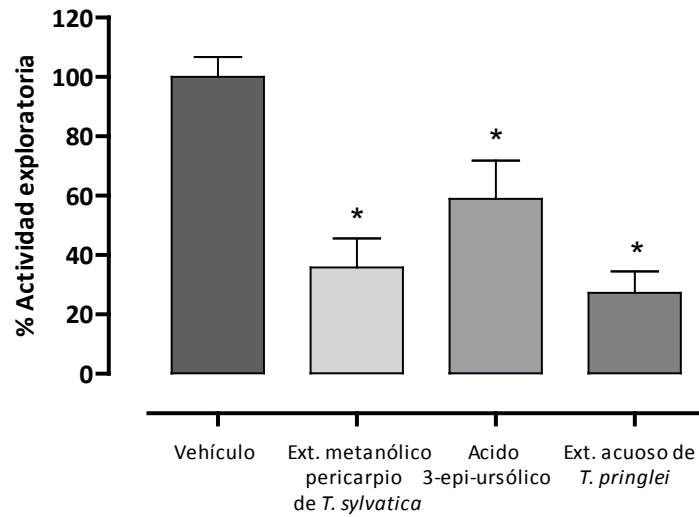
**Figura 25.** Configuración del H-3 en el ácido 3-epi-ursólico y ácido ursólico.



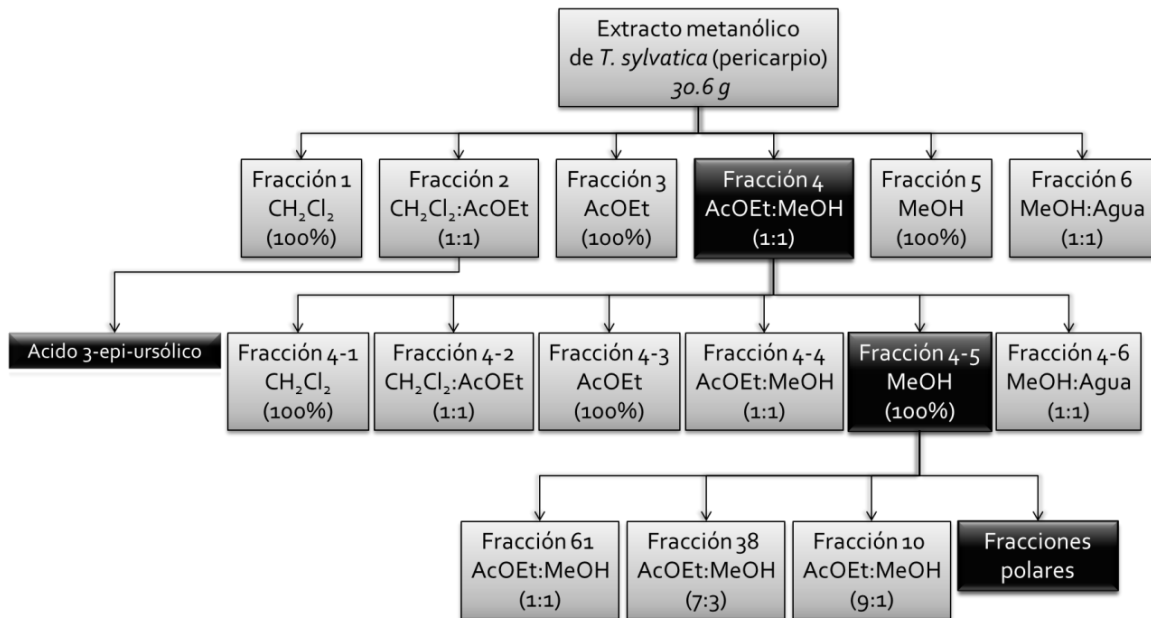
**Figura 26.** Estructura del ácido 3-epi-ursólico (I).

Asimismo, del extracto metanólico del pericarpio de *T. sylvatica*, al ser separada por cromatografía, de la fracción 2 eluída con una mezcla de  $CH_2Cl_2:AcOEt$  (1:1), fue detectada la presencia del ácido 3-epi-ursólico.

Al ser evaluado el ácido 3-epi-ursólico junto con los extractos de los cuales se aisló, se encontró que el ácido 3-epi-ursólico presentó menos actividad sedante en el cilindro de exploración que los extractos de origen, a una dosis de 100 mg/kg y comparado con el control su actividad es apenas del orden del 30-40% (Figura 27). Por lo que esta sustancia no es la responsable del efecto sedante ni del efecto tóxico presente en las plantas. Dicho efecto sedante, de acuerdo con la Figura 28, se va “concentrando” en las fracciones más polares de los extractos (sombreadas con negro), por lo que las sustancias responsables de los efectos son mucho más polares que el ácido 3-epi-ursólico.



**Figura 27.** Efecto sedante a una dosis de 100 mg/kg en el cilindro de exploración del vehículo, extracto metanólico de *T. sylvatica*, extracto acuoso de *T. pringlei* y del ácido 3-epi-ursólico. \*Diferencia estadística significativa,  $P < 0.05$ , con respecto al vehículo, después de un ANOVA de una vía seguida por una prueba de Dunnett.



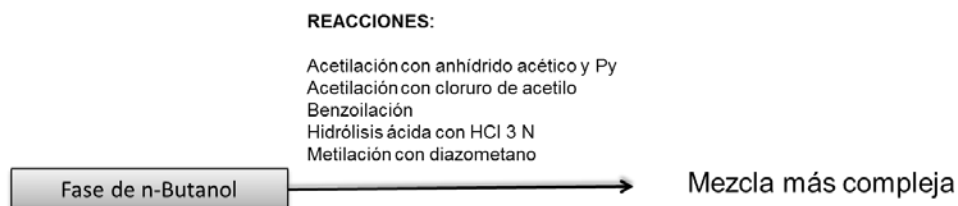
**Figura 28.** Esquema de aislamiento del ácido 3-epi-ursólico a partir de extracto metanólico del pericarpio de *T. sylvatica* y fracciones más activas en la prueba de cilindro de exploración (sombreadas de negro).



## b) 28-O-[ $\beta$ -L-6-ramnopiranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol y su aglicona R<sub>1</sub>-barrigenol.

De 200 g de semillas pulverizadas de *T. sylvatica* y 1.8 L de agua destilada se preparó por decocción por 10 min, el extracto acuoso obteniendo un total de 28.46 g (14.23%) de un sólido beige pálido. Este extracto se particionó con 2.0 L de n-butanol. Ambas fases fueron concentradas y se obtuvieron 12.28 g (43.15% de rendimiento) de fase acuosa y 12.83 g (45.08% de rendimiento) de fase de n-butanol. Ambas fases se probaron para su actividad en el cilindro de exploración y toxicidad a una dosis de 100 mg/kg y se mostró que ambas fases conservan la actividad sedante y tóxica. Se decidió trabajar con la fase de n-butanol debido a que tenía menor pigmentación, aunque en CCF ambas fases mostraban complejidad en su composición.

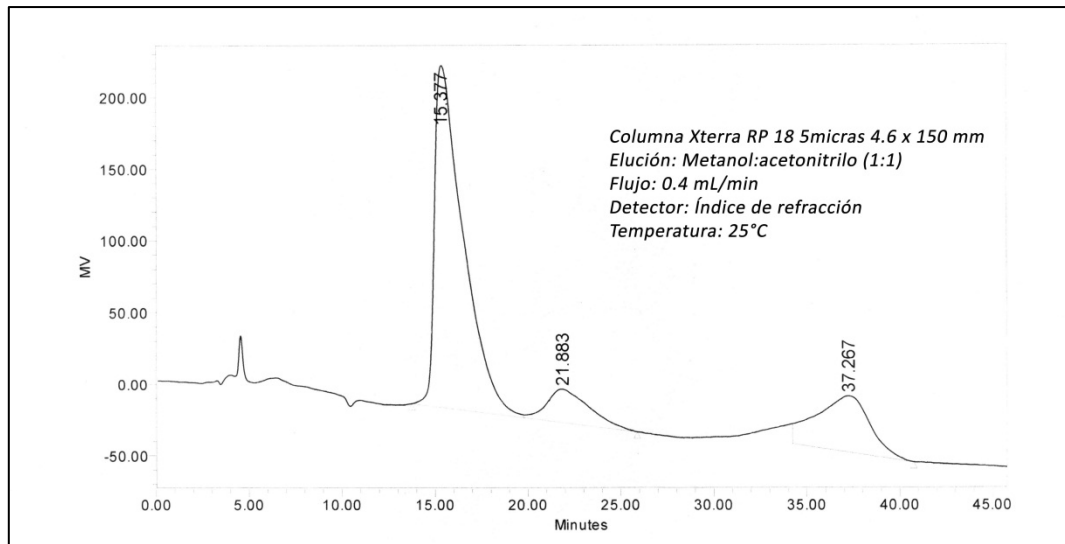
Para disminuir la complejidad de la fase de n-butanol, se realizaron una serie de reacciones sobre los grupos hidroxilo de las sustancias contenidas en el extracto (Figura 29), sin embargo, la complejidad de la muestra se hacía mayor a la inicial, tal vez porque las reacciones no son completas debido a la complejidad de los compuestos presentes. Por lo que se decidió continuar la separación por métodos cromatográficos.



**Figura 29.** Reacciones realizadas a la fase de n-butanol.

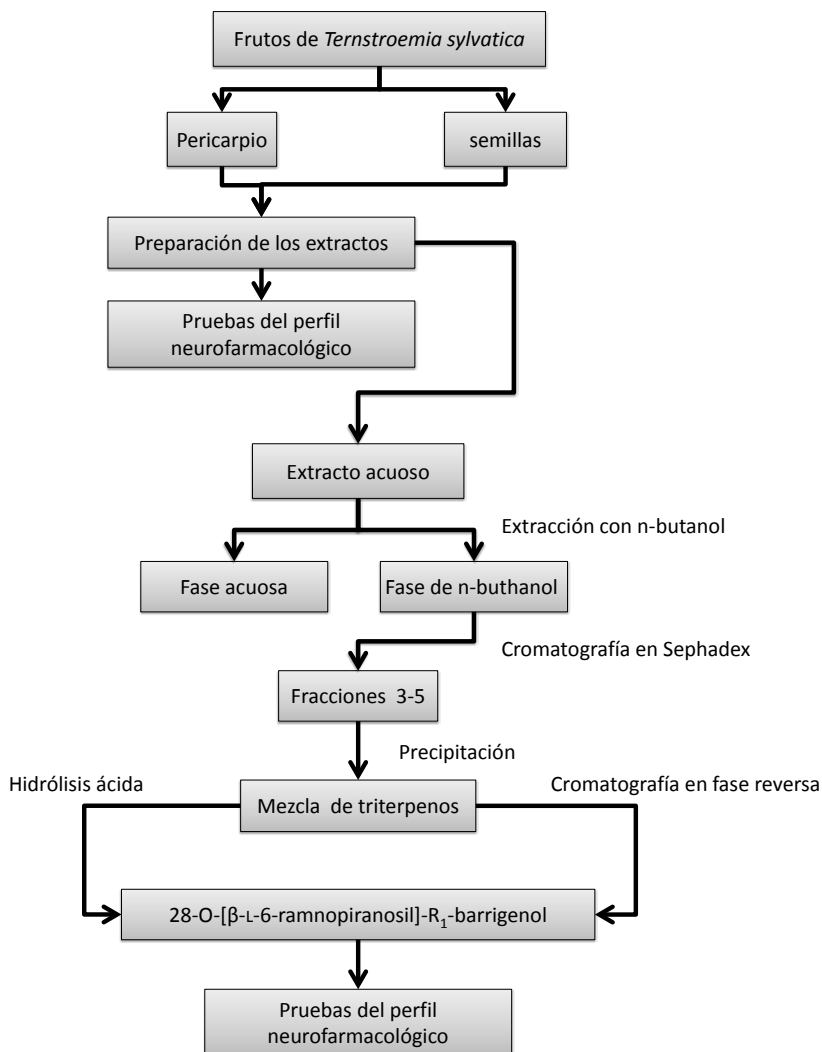
Una muestra de 1 g de la fase de n-butanol, se colocó en una columna de 10 g de Sephadex lipofílico LH-20 (400 x 40 mm) y se eluyó con metanol en fracciones de 50 mL. En las fracciones 3-5 precipitó una sustancia amorfa de color blanco (200 mg). Esta mezcla revela en CCF para triterpenos con el revelador de anisaldehído/ácido sulfúrico, no revela en luz UV (254 nm).

Tanto en CCF (placa no mostrada) y por HPLC con detector de índice de refracción (IRR) se detectan por lo menos 3 sustancias en la mezcla en diferentes proporciones (Figura 30).



**Figura 30.** Cromatograma de la mezcla de triterpenos.

Una muestra de la mezcla de triterpenos fue colocada en una columna de fase reversa y eluída con  $H_2O:MeOH:CH_3CN$  (2:1:1) obteniendo 20 mg de un polvo blanco-amarillento con un punto de fusión de 288-290°C. En el esquema de la Figura 31, se resume el aislamiento de la sustancia.



**Figura 31.** Esquema del aislamiento del 28-O-[\beta-L-6-ramnopiranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol

Dos muestras de 20 mg de la mezcla de triterpenos fueron hidrolizadas independientemente en dos diferentes condiciones:

- Hidrólisis A.** Hidrólisis con HCl 2 N a reflujo por 2.5 h y a temperatura ambiente por 48 h, y posterior neutralización con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10 % p/v en agua) y extracción con diclorometano.
- Hidrólisis B.** Hidrólisis con HCl 2 N a reflujo por 2 h, y posterior neutralización con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10 % p/v en agua) y extracción con diclorometano.

**Hidrólisis A.** De las condiciones descritas en (a) se obtuvo un sólido blanco (7 mg) con un punto de fusión mayor a 300°C. En su espectro de masas por impacto electrónico (Apéndice II, espectro 4) se observa un ión molecular [M-1]<sup>+</sup> a m/z 505 correspondientes a una fórmula molecular de C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>6</sub> que indica que posiblemente es una molécula triterpénica altamente hidroxilada. Los

fragmentos en  $m/z$  207 y  $m/z$  298 corresponden al rompimiento por una reacción retro Diels-Alder, el primer fragmento corresponde a los anillos ABC\* con un grupo hidroxilo, confirmado por la pérdida de un fragmento de 18 unidades para dar el fragmento  $m/z$  189. Mientras que el segundo fragmento,  $m/z$  298, corresponde a los anillos C\*DE con 5 grupos hidroxilos y sin presencia de carboxilo en C-28, afirmación corroborada por el fragmento  $m/z$  458  $[M-CH_2OH]^+$  que indica que en C-28 existe un grupo  $-CH_2OH$ . En la Figura 32, se observa el patrón de fragmentación sugerido para la sustancia.

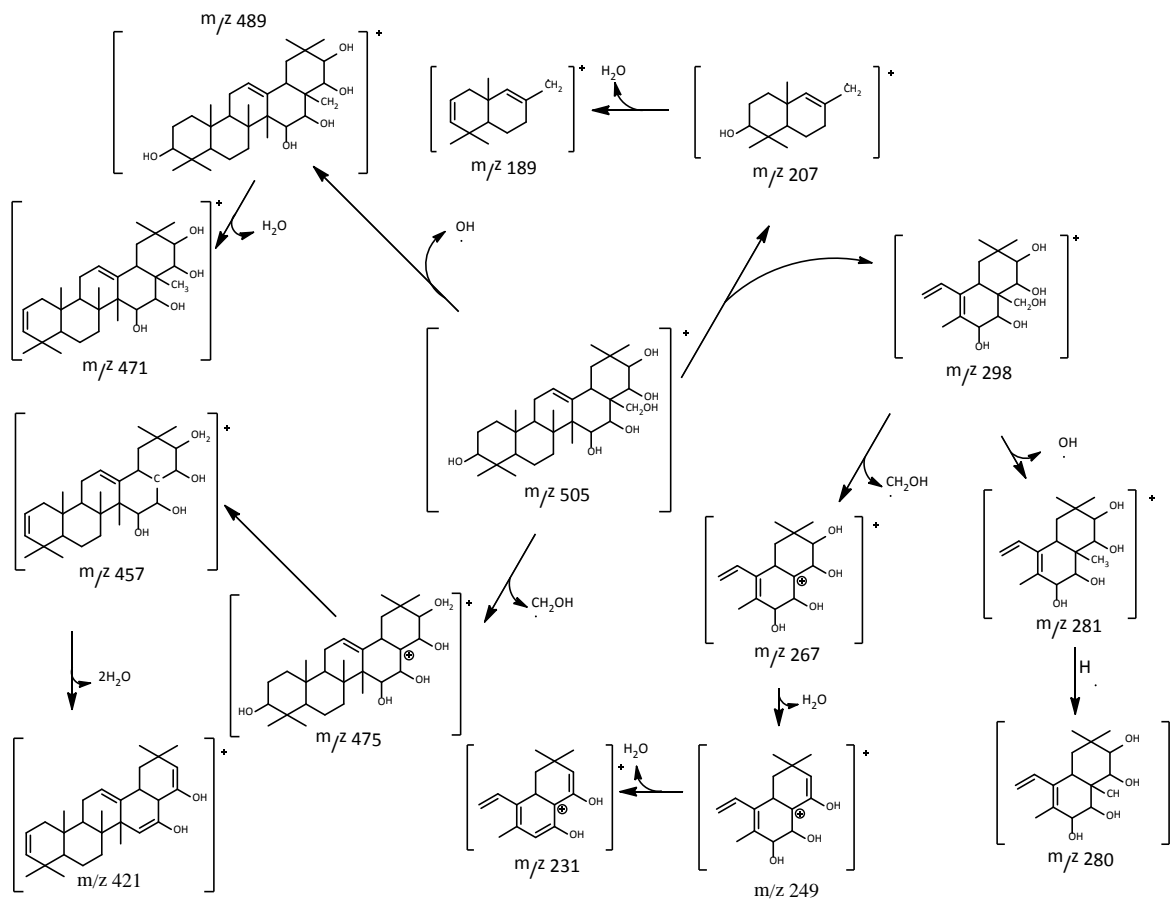
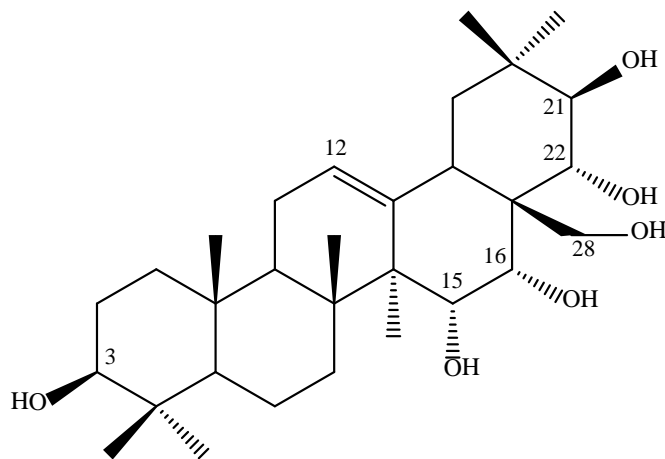


Figura 32. Patrón de fragmentación del  $R_1$ -barrigenol.

En su espectro de  $RMN^1H$  se observan las señales características de un triterpeno: a  $\delta$  5.88 un múltiplete correspondiente al hidrógeno vinílico de la posición 12; 5 singuletes ( $\delta$  1.01,  $\delta$  1.14,  $\delta$  1.20,  $\delta$  1.55 y  $\delta$  1.6) que integran para 3 hidrógenos cada uno y un singulete ( $\delta$  1.48) que integra para 6 hidrógenos, correspondientes a 7 metilos que indican un esqueleto de tipo oleanano; 6 señales correspondientes a hidrógenos base de hidroxilo (a  $\delta$  3.19,  $\delta$  3.88,  $\delta$  3.92,  $\delta$  4.1,  $\delta$  4.27 y  $\delta$  4.57). Comparando estos resultados con los informados en la literatura se concluye que el producto de la hidrólisis es la triterpeno ***R<sub>1</sub>-barrigenol***, III (Fu *et al.*, 2005).



**Figura 33.** Estructura del R1-barrigenol (III).

**Hidrólisis B.** De las condiciones descritas en el punto (b) se obtuvo el mismo polvo blanco obtenido por cromatografía de la mezcla de triterpenos, cuya elucidación estructural se describe a continuación.

En su espectro de masas por FAB negativo (Apéndice II, espectro 6) se observa un fragmento a  $m/z$  651 correspondiente al ión cuasi molecular  $[M-H]^-$  que reveló una fórmula molecular de  $C_{36}H_{60}O_{10}$  mientras que el fragmento observado a  $m/z$  505,  $[M-H-146]^-$  revela la pérdida de una 6-desoxihexosa, y revelar una aglicona con el mismo peso molecular que el R<sub>1</sub>-barrigenol.

En su espectro de RMN<sup>1</sup>H (Apéndice II, espectro 7) se observan 7 singuletes que corresponden a 7 grupos metilo (a  $\delta$  1.88,  $\delta$  1.08,  $\delta$  1.01,  $\delta$  1.25,  $\delta$  1.14,  $\delta$  1.37 y  $\delta$  1.41) y un hidrogeno vinílico a  $\delta$  5.55 (*t*,  $J = 4$  Hz) que revela un esqueleto base de oleanano. También se observan 5 hidrógenos base de hidroxilo a  $\delta$  3.06 (*t*,  $J=12$  Hz),  $\delta$  4.46 (*m*),  $\delta$  4.98 (*m*),  $\delta$  4.85 (*d*,  $J=12$  Hz) y  $\delta$  4.63 (*d*,  $J=12$  Hz), y un metileno base de hidroxilo  $\delta$  4.51 (*m*). Esta última señal fue asignada a H-28, mientras que la señal triple a  $\delta$  3.06 fue asignada a H-3.

En su espectro de RMN<sup>13</sup>C (Apéndice II, espectro 8) se observan un total de 36 carbonos, de los cuales 36 corresponden al esqueleto del triterpeno y los 6 restantes a la desoxihexosa observada en el EM(FAB) negativo. La correlación entre las señales de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se realizó mediante el experimento de correlación heteronuclear HSQC (Apéndice II, espectro 9).

La asignación total de las señales a sus correspondientes hidrógenos y carbonos se realizó mediante los experimentos de correlación homonuclear COSY (Apéndice II, espectro 10), TOCSY (Apéndice II, espectro 11) y de correlación heteronuclear HMBC (Apéndice II, espectro 12).

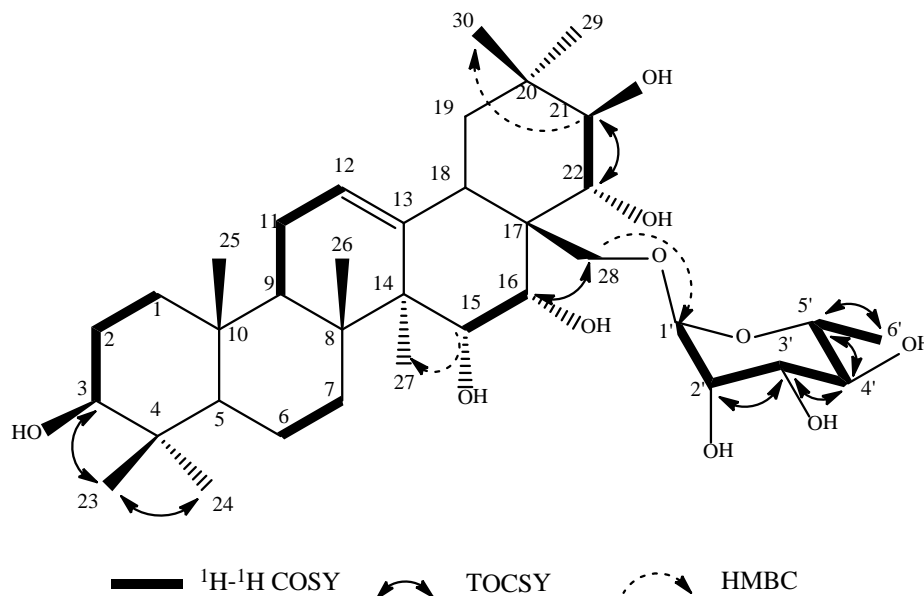
La señal que aparece en  $\delta$  3.06 (*t*,  $J = 12$  Hz) que fue asignada al hidrogeno base de hidroxilo H-3, en el espectro COSY se observa la interacción de esta con la señal de  $\delta$  2.82 (*m*) y ésta a su vez con  $\delta$  1.48 (*dd*,  $J = 4, 12$  Hz), estas mismas interacciones se observan en el espectro TOCSY, por lo que

se asignaron las señales a H-2 y H-1 respectivamente, de esta manera la interacción en TOCSY de los singletes a  $\delta$  1.88 y  $\delta$  1.08 con H-3, indican que estas señales corresponden a los metilos C-23 y C-24.

Asimismo, se observa la interacción por COSY de H-12,  $\delta$  5.55 (*t*,  $J = 4$  Hz), con la señal de  $\delta$  1.98 (*m*) que se asignó entonces a H-11. La interacción en COSY de las señales base de hidroxilo a  $\delta$  4.46 (*m*) y  $\delta$  4.98 (*m*), y las señales  $\delta$  4.81 (*d*,  $J = 12$  Hz) y  $\delta$  4.63 (*d*,  $J = 12$  Hz), indican la presencia de dos dioles vecinales. Las interacciones observadas en TOCSY del diol en  $\delta$  4.46 –  $\delta$  4.98 con H-28 y a un singlete en  $\delta$  1.25, permitieron establecer que el diol se encuentra en las posiciones C-15 y C-16, y el singlete corresponde al metilo C-26; mientras que el segundo diol, en  $\delta$  4.85 –  $\delta$  4.63 interaccionan en TOCSY con los singlete  $\delta$  1.37 y  $\delta$  1.41, lo que permitió la asignación del diol a las posiciones C-21 y C-22, y los singletes a los metilos C-29 y C-30. Las correlaciones por HMBC corroboraron las asignaciones anteriores.

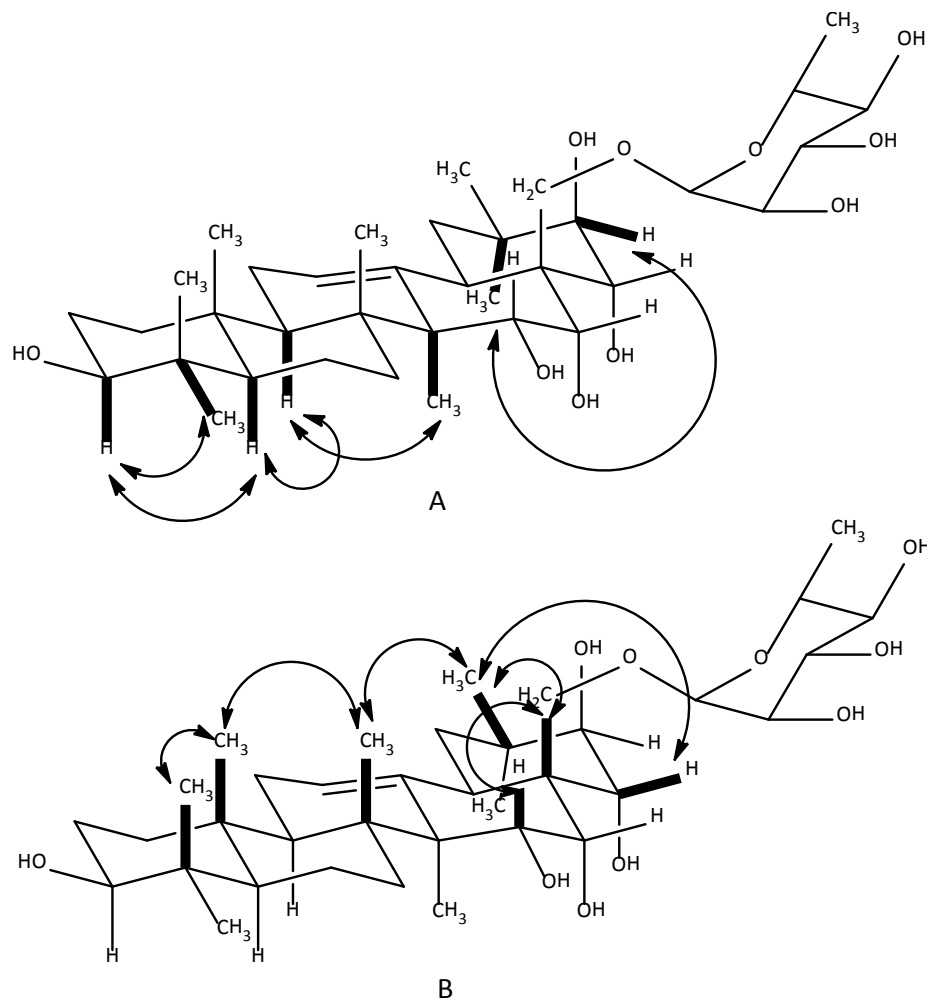
Las interacciones observadas tanto en COSY como en TOCSY de las señales en  $\delta$  1.64 (*d*,  $J = 8$  Hz),  $\delta$  3.63 (*m*),  $\delta$  4.13 (*m*), 4.26 (*t*,  $J = 8$  Hz) y 4.44 (*dd*,  $J = 4, 8$  Hz), permitieron asignar estas señales a los hidrógenos de la hexosa en las posiciones H-6', H-5', H-4', H-3' y H-2' respectivamente, además la multiplicidad de esta última corrobora que se trata de una desoxihexosa. La interacción en HMBC de la señal de H-28 en  $\delta$  4.51 con la señal en 5.12 (*d*,  $J = 4$  Hz), que es el hidrógeno anomérico de la desoxihexosa, indican que la desoxihexosa se encuentra unida en C-28. Los datos de espectroscopia de la desoxihexosa, así como la derivación de del hidrolizado con SigmaSil a 60°C por 15 minutos y su comparación por CG-EM, permitieron identificar a la desoxihexosa como la L-Ramnososa (Kartal *et al.*, 2006).

En la Figura 34, se muestran las principales interacciones de los experimentos COSY, TOCSY y HMBC.



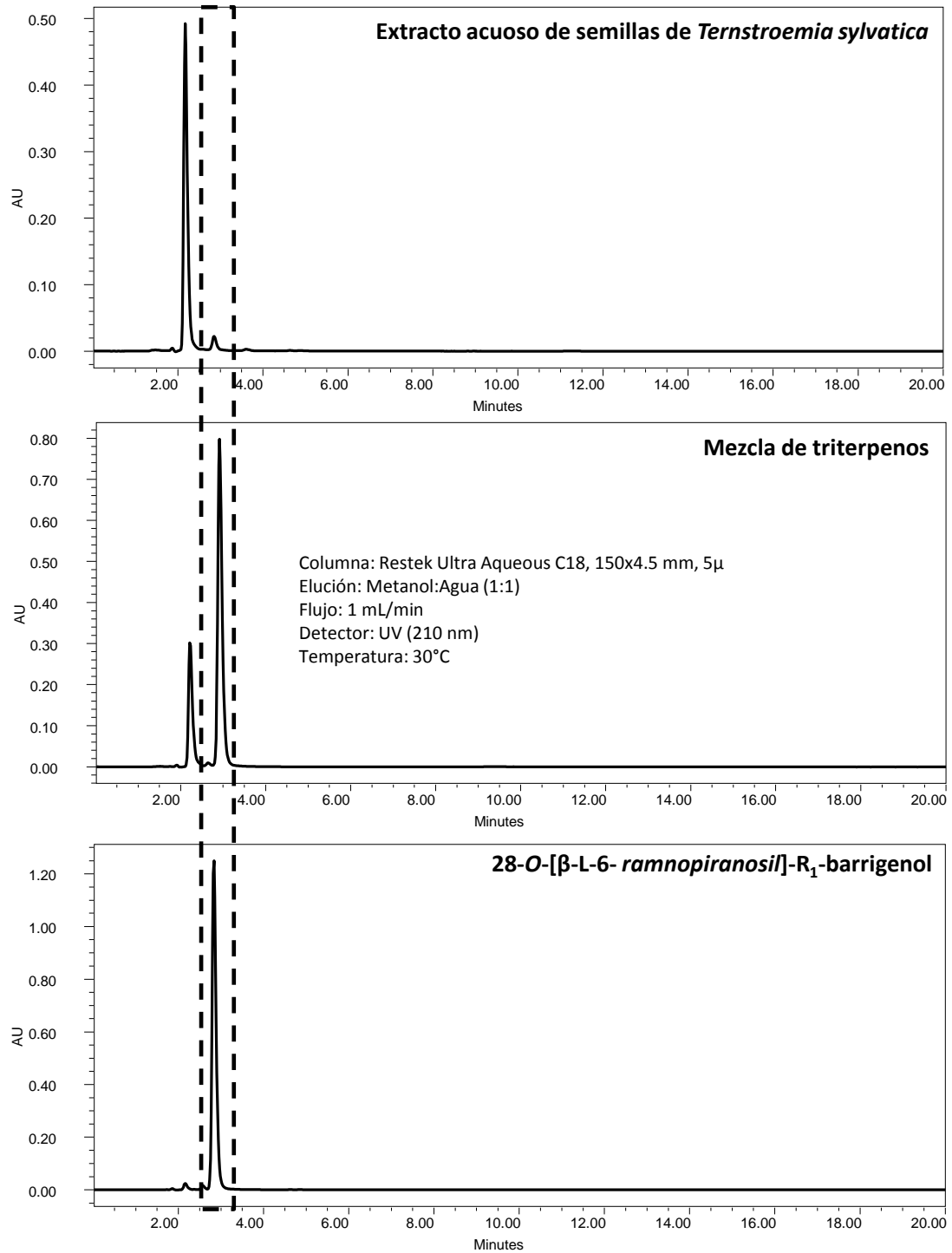
**Figura 34.** Principales correlaciones de 28-O-[ $\beta$ -L-6-ramnopyranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol.

La configuración relativa de los metilos y los hidrógenos base de los hidroxilos se realizó mediante el espectro de correlación homonuclear NOESY (Figura 35).



**Figura 35.** Correlaciones en el espectro NOESY de tipo  $\alpha$  (A) y  $\beta$  (B) de 28-O-[β-L-6-ramnopiranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol

Los datos de espectroscopia permitieron identificar a la sustancia como **28-O-[β-L-6-ramnopiranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol**, un producto natural novedoso y muy posiblemente la responsable de los efectos tóxicos de las semillas de *T. sylvatica*, debido a que es la sustancia mayoritaria de la mezcla de triterpenos (Figura 13). Para corroborar, la presencia del triterpeno, se eluyeron muestras en HPLC del extracto, de la mezcla de triterpenos y el triterpeno aislado (Figura 36).



**Figura 36.** Cromatograma del triterpeno aislado, mezcla de triterpenos y el extracto acuoso de semillas de *T. sylvatica*.



Los resultados de la evaluación neurofarmacológica del 28-O-[ $\beta$ -L-6-ramnopiranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol por vía intraperitoneal se resumen en el Cuadro 11.

**Cuadro 11. Pruebas del perfil neurofarmacológico del 28-O-[ $\beta$ -L-6-ramnopiranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol.**

Prueba	Valor determinado
Cilindro de exploración	DE <sub>50</sub> = 0.120 ± 0.01mg/kg
Tablero de hoyos	DE <sub>50</sub> = 1.020 ± 0.01mg/kg
Campo abierto	DE <sub>50</sub> = 0.351 ± 0.11 mg/kg
Toxicidad aguda	DL <sub>50</sub> = 1.110 ± 0.23 mg/kg

Los resultados anteriores permiten afirmar que el triterpeno aislado posee actividad tanto sedante como tóxica, sin embargo, los valores tan pequeños y cercanos entre sí, permiten plantear la hipótesis de que lo que se observa en realidad como efecto sedante es un efecto tóxico leve o los primeros signos de toxicidad.

Cabe señalar que no se han encontrado reportes de toxicidad de *Ternstroemia sylvatica* en seres humanos por ingerir la infusión de los mismos, por lo cual, los resultados obtenidos en nuestro estudio nos permiten realizar las siguientes hipótesis:

1. La toxicidad está restringida sólo a los roedores, mientras que en humanos sólo se observa el efecto sedante/tranquilizante.
2. Tanto en humano como en roedores existe la toxicidad, sin embargo, el índice terapéutico en humanos es mayor que en roedores.
3. Tanto en humanos como en roedores existe la toxicidad, sin embargo, los signos de toxicidad en humanos no se le han atribuido a la planta sino a otros factores.

Por ello, es necesario continuar con un estudio clínico, semejante a los realizados en la Fase I del desarrollo de fármacos, para estudiar los efectos tóxicos y/o adversos al ingerir el extracto o decocción de los frutos de las especies de *Ternstroemia* estudiadas, para descartar o confirmar los efectos observados en los animales de laboratorio. Hasta entonces se podrá afirmar si los frutos de estas especies son o no tóxicos para el consumo humano.

## CONCLUSIONES

Las semillas de *Ternstroemia sylvatica* contienen un triterpeno con actividad tóxica, 28-O-[ $\beta$ -L-6-ramnospiranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol. Esta acción principal de los frutos de la planta y los efectos neurofarmacológicos reportados en éste y otros estudios pueden ser una manifestación temprana de la toxicidad.

Con respecto a *Ternstroemia pringlei*, no se pudo aislar un metabolito secundario responsable de la actividad tóxica presentada, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que sea un triterpeno de estructura similar presente en las fracciones más polares de los extractos.

Además, el efecto sedante ni el tóxico no se presentan por administración intragástrica en roedores, lo que significa que existe un componente farmacocinético importante en los efectos, este componente puede contribuir a que no se observe dicho efecto en humanos.

## REFERENCIAS

- Adverse Drug Reactions Advisory Committee (ADRAC). 1998. *Australian Adverse Drug Reactions Bulletin*, 17(3):10-11.
- Aguilar-Santamaría L y Tortoriello J. 1996. Anticonvulsant and sedative effects of crude extracts of *Ternstroemia pringlei* and *Ruta chalepensis*. *Phytotherapy Research* 96:531-533.
- Aguirre-Hernández, Martínez A, González-Trujano M, Moreno J, Vibrans H y Soto-Hernández M. 2007. Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. *mexicana* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 109:140-145.
- Alcántara O, Luna I y Velázquez A. 2002. Altitudinal distribution patterns of Mexican cloud forest based upon preferential characteristic genera. *Plant Ecology* 161:167-174.
- Attele A, Wu J y Yuan C. 1999. Ginseng pharmacology. *Biochemical Pharmacology*, 58:1685–1693.
- Azuno Y, Yaga K, Sasayama T, Kimoto K. 1999. Thrombocytopenia induced by Jui, a traditional Chinese herbal medicine. *Lancet* 354:304-305.
- Balderas J, Reza V, Ugalde M, Guzmán L, Serrano M, Aguilar A, Navarrete A. 2008. Pharmacodynamic interaction of the sedative effects of *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standl. with six central nervous system depressant drugs in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 119:47–52.
- Ballas P. 2006. *Trastornos del sueño*. Artículo en línea. MedLine Plus, Diciembre del 2006. Vínculo disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000800.htm>
- Barnes J, Anderson L, Phillipson J. 2001. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53:583–600.
- Bartholomew B, McVaugh R. 1997. Identification and typification of *Ternstroemia lineata* de Candolle (Theaceae). *Novon* 7:14-16
- Boissier J, Simon P. 1962. La reaction d'exploration chez la souris. *Therapie* 17:1225-1232.
- Boom B. 1989. New species of *Ternstroemia* (Theaceae) from Guayana Highland. *Brittonia*: 41(2):136-142.
- Bourin M, David D y Dhonnchadha N. 2002. Sedation: a non-specific phenomenon. *Bulletin of Clinical Psychopharmacology* 12(1):37-40.
- Calhoun J, Calhoun D. 1996. Prolonged bleeding time in a patient treated with sertraline (letter). *American Journal of Psychiatry* 153:443.

- Carlini E. 2003. Plants and the central nervous system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 75:501-512.
- Chen W, Wende M y Yu M. 1989. Chemical properties and tannins power of the Houpixiang (*Ternstroemia gymnanthera*) tannin. *Chengdu Keji Daxue Xuebao* 2:125-138.
- Clement J, Yoder B y Kingston D. 2004. Natural products as a source of CNS-active agents. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 1:183-208.
- Di Carlo G, Borrelli F, Ernst E e Izzo A. 2001. St John's wort: Prozac from the plant kingdom. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(6):292–297.
- Fernández L, Pérez H y Más R. 1989. Evaluación preliminar de los efectos neurofarmacológicos de la *Justicia pectoralis* Jacq. *Revista Cubana de Farmacia*, 23(1-2):161-6
- Fu G, Wang Y, Gao S, Tang M, Yu S. 2005. Five New Cytotoxic Triterpenoid Saponins from the Roots of *Symplocos chinensis*. *Planta Medica* 71:666-672.
- George J, Aster R. 2009. Drug-induced thrombocytopenia: pathogenesis, evaluation, and management. *Hematology* 153-158.
- Gilani A, Aziz N, Khan M, Shaheen F, Jabeen Q, Siddiqui B, Herzig J. 2000. Ethnopharmacological evaluation of the anticonvulsant, sedative and antispasmodic activities of *Lavandula stoechas* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(1–2):161–167.
- Gomes N, Campos M, Órfão J y Ribeiro J. 2009. Plants with neurobiological activity as potencial targets for drug discovery. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 33:1372-1389.
- Gómez G. 2011. Trastornos mentales en México: un desafío poco visible. *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 14(1):21-28.
- González-Trujano M, Martínez A, Reyes-Ramírez A, Reyes-Trejo B y Navarrete A. 2006. Palmitone isolated from *Annona diversifolia* induces an anxiolytic-like effect in mice. *Planta Medica*, 72:703-707.
- González-Trujano M, Carrera D, Ventura-Martínez R, Cedillo-Portugal E y Navarrete C. 2006. Neuropharmacological profile of an ethanol extract of *Ruta chalepensis* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 106:129-135.
- González-Trujano M, Navarrete A, Reyes B y Hong E. 1998. Some pharmacological effects of the ethanol extract of leaves of *Annona diversifolia* on the Central Nervous System in mice. *Phytotherapy Research* 12:600-602.

Hee M, Wang W, Nam K, Jo Y, Jung J y Sik K. 2003. Triterpenoid Saponins from the Fruits of *Ternstroemia japonica*. *Journal of Natural Products*, 66:1351-1355.

Hendriks H, Bos R, Woerdenbag H y Koster A. 1985. Central nervous depressant activity of valerenic acid in the mouse. *Planta Medica*, 51(1):28-31

Hiller K, Zetler G. 1996. Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis* L.: behavioral and anticonvulsant properties. *Phytotherapy Research* 10:145-151.

Hoose T, Lisuka T, Chiba Y, Itabashi T, Morita H, Ishizaki T y Kawai K. 2006. Relaxing effects of *Phellinus gilvus* extract and purified ebricoic acid on rat aortic rings. *Journal of Natural Medicine* 60:130-134.

Horgen F, Edrada R, De los Reyes G, Agcaoili F, Madulid D, Wongpanich V, Angerhofer C y Pezzuto J. 2001. Biological screening of rain forest plot from Palawan Island (Philippines). *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 8(1):71-81.

Ikuta A, Tomiyasu H, Morita Y y Yashimura K. 2003. Ursane- Oleanane-Type triterpenes from *Ternstroemia gymnanathera* callus tissues. *Journal of Natural Products* 66:1051-1054.

Jo Y, Suh J, Hee M, Jung J y Sik Im K. 2005. Jacaranone and related compounds from the fresh fruits of *Ternstroemia japonica* and their antioxidative activity. *Archives of Pharmacal Research*, 28(8):885-888.

Klein J, Chatterjee S, Loffelholz K. 1997. Phospholipid breakdown and choline release under hypoxic conditions: inhibition by bilobalide, a constituent of *Ginkgo biloba*. *Brain Research*, 755:347-350.

Kalant H, Roschlau W, 2002. Principios de farmacología médica. Sexta edición, Oxford University Press, México: 317-319.

Kartal M, Mitaine-Offer A, Paululat T, Abu-Asaker M, Wagner H, Mirjolet J, Guilbaud N y Lacaille-Dubois M. 2006. Triterpene saponins from *Eryngium campestre*. *Journal of Natural Products*, 69(7):1105-1108.

Kikuchi K y Yamaguchi M. 1974. The structure of trenstroemioxanthin, a new aldehydic C<sub>40</sub>-carotenoid. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 47(4):885-887.

Kirmizigil S, Hliseyin H, Rose M. 1995. Triterpenoid glycosides from *Cephalaria transsylvanica*. *Phytochemistry* 39:1171-1174.

Knutsen A, Anderson J, Satayaviboon S, Slavin R. 1984. Immunologic aspects of phenobarbital hypersensitivity. *Journal of Pediatrics* 105:558-63.

Kobuski C. 1942. Studies in the Theaceae---XIII. Notes on the Mexican and Central American species of *Ternstroemia*. *Journal of Arnold Arboretum* 23:464-478.

Lee C, Lee C. 1989. Thrombocytopenia – a rare but potentially serious side effect of initial daily and interrupted use of Rifampicin. *Chest* 96:202-203.

López-Luengo M. 2006. Insomnio. Abordaje fitoterapéutico. *Ambito Farmacéutico Fitoterapia*, 25(7):60-63.

Lozada-Lechuga J, Villarreal M, Fliniaux M, Bensaddek L, Mesnard F, Gutiérrez M y Cardoso-Taketa A. 2010. Isolation of jacaranone, a sedative constituent extracted from the flowers of Mexican tree *Ternstroemia pringlei*. *Journal of Ethnopharmacology* 127(2):551-554.

Luna I, Alcántara O y Contreras-Medina R. 2004. Patterns of diversity, endemism and conservation: an example with Mexican species of *Ternstroemiaceae* Mirb. Ex DC. (*Tricolpates: Ericales*). *Biodiversity and Conservation* 13:2723-2739.

Luna I. 1997. Relaciones filogenéticas de los géneros de la familia *Theaceae* D. Don. Tesis de Doctorado (Ciencias (Biología)), UNAM, México: 185-189.

Luo Q, Ma W, Zeng X, Sun D, Foo L y Wong H. 1994. Study on tannins from *Ternstroemia gymnanthera* bark and their properties for adhesive preparation. *Linchan Huaxue Yu Gongye* 14(3):15-20.

Mahmud J, Mathews M, Verma S, Basil B. 2006. Oxcarbazepine-induced thrombocytopenia. *Psychosomatics* 47:73-74.

Molina M, Contreras C, Téllez-Alcántara P, Rodríguez F. 1999. Sedative action of *Ternstroemia sylvatica* in the male rat. *Phytomedicine* 6:115-118.

Mukherjee K S, Bhattacharya M K y Ghosh P K. 1982. A triterpene acid constituent of *Salvia lanata*. *Phytochemistry* 21(9):2416-2417.

Ohmori T, Nishii K, Hagihara A, Takeda M, Sekido K. 2004. Acute thrombocytopenia induced by Jui, a traditional herbal medicine. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2:1479-1480.

Oliva I, González-Trujano M, Arrieta J, Enciso-Rodríguez R, Navarrete A. 2004. Neuropharmacological profile of hydroalcoholic extract of *Valeriana edulis* ssp. *procera* roots in mice. *Phytotherapy Research* 18:290-296.

Pittler M y Ernst E. 2000. Efficacy of kava extract for treating anxiety: systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 20(1): 84-89.

Reiche C. 1977. Flora excursoria en el Valle Central de México. Edit. Porrúa, México: 98-99.

- Rolland A, Fleurentin J, Lanhers M, Younos C, Misslin R, Mortier F, Pel J. 1991. Behavioral effects of the American traditional plant *Eschscholzia californica*: Sedative and anxiolytic properties. *Planta Medica*, 57:212-216.
- Rzedowski J y Rzedowski G (editores). 1985. Flora fanerógámica del Valle de México. Volumen II. *Dicotyledoneae (Euphorbiaceae-Compositae)*. Instituto de Ecología, México: 70-73.
- Saeki I, Sumimoto M y Kondo T. 1968. Antitermitic substance of *Ternstroemia japonica* wood. III. Biological test of the antitermic substance. *Mokuzai Gakkaishi*, 14(2):110114.
- Sala A, Vallès J. 1993. Fitoterapia sedante. *El Farmacéutico*, 131: 53-57.
- Sánchez O. 1979. La flora del Valle de México. Edit. Herrero, México: 258-259.
- Santos W, Ronney R, Torres L, Palatnik M, Parente Jf J y Palatnik C. 1997. Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponin on the humoral response to the FML antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine*, 15(9):1024-1029.
- Seebacher S, Simic N, Weis R, Saf R y Kunert O. 2003. Complete assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR resonances of oleanolic acid, 18 $\alpha$ -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 41(8):636–638.
- Semarnat. *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standl. (Monografía en línea). Agosto del 2006. Vínculo disponible en: <http://www.semanat.gob.mx/pfnm2/fichas/ternstroemiaPringlei.htm>
- Shepherd M. 1972. The classification of psychotropic drugs. *Psychological Medicine*, 2:96-110.
- Shin M, Wang W, In Nam K, Jo Y, Jung J y Sik In K. 2003. Trieterpenoid saponins from the fruits of *Ternstroemia japonica*. *Journal of Natural Products* 66:1351-1355.
- Smati D, Mitaine-Offera A, Miyamoto T, Hammicheb V y Lacaille-Dubois M. 2007. Ursane-type triterpene saponins from *Zygophyllum geslini*. *Helvetica Chimica Acta*, 90:712-719.
- Speroni E y Minghetti A. 1988. Neuropharmacological activity of extracts from *Pasiflora incarnata*. *Planta Medica*, 54(6):488-491.
- Swinyard E, Woodhead J, White H, Franklin M. 1989. General principles: experimental selection, quantification and evaluation of anticonvulsants. En: Levy R, Mattson R, Meldium B, Penry J, Dreifuss F (Editores). *Antiepileptic Drugs*, Raven Press, LTD New York: 233–239.
- Tennis P, Stern R. 1997. Risk of serious cutaneous disorders after initiation of use of phenytoin, carbamazepine, or sodium valproate: a record linkage study. *Neurology* 49:542–546.
- Tichy E, Militano U, Bessmertny O. 2003. A Case of Severe Thrombocytopenia and Antiepileptic Hypersensitivity Syndrome. *The Journal of Pediatrics Pharmacology and Therapeutics* 8:29.

Tori M, Fukuyama H, Nakashima K y Sono M. 2005. Degraded terpenoids and aromatic compounds from *Ternstroemia gymnanthera*. *Letters in Organic Chemistry* 2:262-264.

Tortoriello J, Romero O. 1992. Plants used by Mexican with presumable sedative properties: An ethnobotanical approach. *Archives of Medical Research* 23:111-116.

Ugalde M, Reza V, González-Trujano M, Avula B, Khan I y Navarrete A. 2005 Isobolographic analysis of the sedative interaction between six central nervous system depressant drugs and *Valeriana edulis* hydroalcoholic extract in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57:631-639.

Vogel G y Vogel W (editores). 1997. *Drug discovery and evaluation. Pharmacological assays*. Springer, Alemania: E.1.2.1.

Walsh R, Cummins R. 1976. The Open-Field Test: a critical review. *Psychological Bulletin* 83(3):482-504.

Wheathel D. 2005. Medicinal plants for insomnia: a review of their pharmacology efficacy and tolerability. *Journal of Psychopharmacology* 19(4):414-421.

Yoshioca I, Takeda R, Matsuda A y Kitagawa I. 1972. Saponin and sapogenol. V. Sapogenol constituents of seeds of *Camelia sasanqua* and leaves of *Ternstroemia japonica*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 20:1237-1242.

Youngmi J, Jiyoun S, Myoung H, Jee H y Kwang S. 2005. Jacaranone and Related Compounds from the Fresh Fruits of *Ternstroemia japonica* and their Antioxidative Activity. *Archives of Pharmacal Research* 28(8):885-888.



## ANEXO 1. TABLAS DE RESULTADOS COMPLETAS

**Cuadro A1.** Actividad sedante y mortalidad de los extractos por vía p.o. en ratones.

Planta	Dosis (mg/kg)	Dosis única		Dosis repetida por 5 días	
		Levantamientos/5 min $\pm$ EEM	Mortalidad	Levantamientos/5 min $\pm$ EEM	Mortalidad
Vehículo	--	55.17 $\pm$ 3.91	0/24	52.65 $\pm$ 3.72	0/17
<i>Ternstroemia pringlei</i>	100	47.17 $\pm$ 3.85	0/6	55.83 $\pm$ 5.22	0/6
	316	52.83 $\pm$ 3.73	0/6	42.5 $\pm$ 5.82	0/6
	1000	52.33 $\pm$ 4.53	0/6	46.17 $\pm$ 3.96	0/6
	1333	52.83 $\pm$ 6.44	0/6	46 $\pm$ 4.51	0/6
	1778	34.0 $\pm$ 5.89 *	0/6	42.67 $\pm$ 8.29	0/6
<i>Ternstroemia sylvatica</i> (pericarpio)	100	49.33 $\pm$ 3.58	0/6	55.67 $\pm$ 3.83	0/6
	316	40.17 $\pm$ 5.19	0/6	53.33 $\pm$ 7.34	0/6
	1000	50.5 $\pm$ 4.37	0/6	55.33 $\pm$ 6.47	0/6
	1333	40.5 $\pm$ 6.45	0/6	46.17 $\pm$ 4.69	0/6
	1778	30.67 $\pm$ 4.36 *	0/6	47 $\pm$ 5.30	0/6
<i>Ternstroemia sylvatica</i> (semillas)	5.6	32.0 $\pm$ 5.74 *	0/6	63 $\pm$ 3.531	0/6
	10	38.0 $\pm$ 2.98	0/6	60.17 $\pm$ 6.794	0/6
	100	40.17 $\pm$ 6.33	0/6	55.5 $\pm$ 7.676	0/6
	316	35.75 $\pm$ 7.78	0/6	39.67 $\pm$ 20.92	3/6
	1000	37.33 $\pm$ 5.55	0/6	30 $\pm$ 0	5/6
	1333	35.83 $\pm$ 11.68	0/6		
	1778	35.17 $\pm$ 6.54	0/6		

\*Diferencia estadística significativa,  $P < 0.05$ , con respecto al control, después de un ANOVA de una vía seguida por una prueba de Dunnett.

**Cuadro A2.** Actividad exploratoria en la prueba de campo abierto.

Planta	Dosis (mg/kg)	Actividad exploratoria (cuadros/2 min)		
		Ext. Metanólico	Ext. Acuoso	Diacepam
Vehículo	--			62.2 ± 3.5
<i>Ternstroemia pringlei</i>	32	80 ± 8.6	47.7 ± 8.9	
	56	63.2 ± 8.1		
	100	63.2 ± 7.1	33.8 ± 8.1 *	
	178	28.2 ± 8.2*		
	316	25.3 ± 3.8*	44.2 ± 8.7	
	562	28.2 ± 3.8*	25.5 ± 3.6 *	
<i>Ternstroemia sylvatica</i> (pericarpio)	32	29.3 ± 4.7 *	47.5 ± 5.3	
	56	36.7 ± 6.1 *		
	100	37.7 ± 7.9 *	37.2 ± 6.6 *	
	316	22.2 ± 3.2 *	26.3 ± 6.0 *	
	562	13.5 ± 2.2 *	49.8 ± 11.4	
<i>Ternstroemia sylvatica</i> (semillas)	3	42.7 ± 5.9 *		
	10	29.4 ± 5.1 *	54.8 ± 5.6	
	32	11.7 ± 4.4 *	26.7 ± 4.7 *	
	56	3.0 ± 2.2 *	5.5 ± 1.9 *	
	100	1.5 ± 0.6 *	4.2 ± 0.8 *	
	178		0.8 ± 0.6 *	
	316	0	1.2 ± 0.4 *	
Diacepam	Vehículo			88.0 ± 10.2
	0.32			67.8 ± 6.6
	1			66.5 ± 4.4
	3.2			65.8 ± 10.6
	5.6			53.5 ± 10.5 *

\*Diferencia estadística significativa,  $P < 0.05$ , con respecto al control, después de un ANOVA de una vía seguida por una prueba de Dunnett.

**Cuadro A3.** Efecto anticonvulsivo sobre convulsiones producidas por PTZ en ratones.

Planta más PTZ	Dosis (mg/kg)	Ext. Metanólico			Ext. acuoso		
		Latencia a las convulsiones (s)		Mort.	Latencia a las convulsiones (s)		Mort.
		Clónicas	Tónicas		Clónicas	Tónicas	
Vehículo	--	35.0 ± 1.3	41.3 ± 1.9	34/34			
<i>Ternstroemia pringlei</i>	32	38.7 ± 1.5	59.3 ± 6.8	6/6	41.7 ± 2.3	50.8 ± 2.8	6/6
	56	51.5 ± 9.1	58.7 ± 8.8	6/6			
	100	77.5 ± 17.7 *	140.5 ± 37.6 *	6/6	49.8 ± 4.9	63.7 ± 8.4	6/6
	178	46.6 ± 2.6	60.6 ± 6.9	6/6			
	316	56.7 ± 9.4 *	75.7 ± 14.8	6/6	76.0 ± 27.6 *	86.2 ± 26.9 *	6/6
	562	55.3 ± 3.4 *	66.5 ± 4.6	6/6	44.2 ± 3.0	59.7 ± 7.5	6/6
<i>Ternstroemia sylvatica</i> (pericarpio)	32	60.5 ± 11.6 *	83.5 ± 14.9 *	6/6	55.0 ± 2.9 *	70.8 ± 4.6 *	6/6
	56	53.3 ± 3.6 *	70.0 ± 6.8 *	6/6			
	100	44.2 ± 3.4	62.0 ± 6.6 *	6/6	58.0 ± 5.7	68.0 ± 5.8 *	6/6
	316	47.8 ± 1.4 *	56.7 ± 2.3	6/6	45.7 ± 3.6 *	64.0 ± 5.4 *	6/6
	562	46.2 ± 0.9	54.3 ± 1.8	6/6	64.2 ± 8.9 *	84.7 ± 16.1 *	6/6
<i>Ternstroemia sylvatica</i> (semillas)	3	42.5 ± 3.8	53.3 ± 5.5	6/6			
	10	57.2 ± 3.2	73.4 ± 8.8 *	6/6	44.8 ± 3.7	57.5 ± 7.8	6/6
	32	102.0 ± 8.1 *	133.2 ± 13.2 *	6/6	58.5 ± 2.9	79.7 ± 4.6	6/6
	56	346.7 ± 35.9 *	407.8 ± 38.0 *	6/6	260.0 ± 25.5 *	374.8 ± 18.8 *	6/6
	100	461.8 ± 106.7 *	714.2 ± 133.3 *	6/6	238.0 ± 53.3 *	299.0 ± 62.7 *	6/6
	178				835.2 ± 209.5 *	899.0 ± 376.0 *	2/6 †
Diacepam	Vehículo	33.0 ± 1.7	42.5 ± 7.3	6/6			
	0.32	42.8 ± 3.5	56.8 ± 6.8	1/6			
	1	51.2 ± 2.9	89.2 ± 19.7 *	0/6			
	3.2	96.8 ± 6.3 *	123.8 ± 10.4 *	0/6			
	5.6	177.2 ± 13.2 *	&	0/6			

\*Diferencia estadística significativa,  $P < 0.05$ , con respecto al control, después de un ANOVA de una vía seguida por una prueba de Dunnett.

**Cuadro A4.** Efecto ansiolítico en el tablero de hoyos en ratones.

Planta	Dosis (mg/kg)	Hoyos explorados en 3 min.	
		Ext. Metanólico	Ext. Acuoso
Vehículo	--	36.6 ± 3.2	
<i>Ternstroemia pringlei</i>	32	44.8 ± 4.9	31.0 ± 6.2
	56		42.2 ± 5.4
	100	30.3 ± 4.6	36.2 ± 3.8
	316	16.3 ± 3.0 *	
	562	20.8 ± 2.5 *	
<i>Ternstroemia sylvatica</i> (pericarpio)	32	43.8 ± 4.6	33.7 ± 4.4
	56		23.7 ± 4.1
	100	32.3 ± 3.8	27.0 ± 1.4
	316	14.2 ± 3.5 *	
	562	15.3 ± 3.8 *	
<i>Ternstroemia sylvatica</i> (semillas)	3	18.5 ± 3.9 *	
	10	27.0 ± 5.3	30.2 ± 3.3
	18	14.8 ± 2.6 *	
	32	5.3 ± 1.5 *	16.3 ± 2.9 *
	56		4.5 ± 1.0 *
	100	3.2 ± 0.9 *	3.7 ± 1.1 *
Diacepam	Vehículo	32.3 ± 3.6	
	0.32	25.7 ± 5.8	
	1	19.7 ± 3.4 *	
	3.2	15.2 ± 3.4 *	
	5.6	18.0 ± 3.9 *	

\*Diferencia estadística significativa, P<0.05, con respecto al control, después de un ANOVA de una vía seguida por una prueba de Dunnett.

**Cuadro A5.** Potenciación del efecto hipnótico del pentobarbital en ratones.

Grupo más pentobarbital	Dosis (mg/kg)	Extracto metanólico			Extracto acuoso		
		Latencia a la hipnosis (s)	Duración de la hipnosis (s)	Mort.	Latencia a la hipnosis (s)	Duración de la hipnosis (s)	Mort.
Vehículo	--	227.7 ± 8.0	1944.9 ± 237.9	0/6			
<i>Ternstroemia pringlei</i>	32	256.8 ± 7.7 *	2394.0 ± 354.0	0/6	222.3 ± 13.8	3720.5 ± 214.6 *	0/6
	56				209.7 ± 15.3	2642.3 ± 259.3	0/6
	100	302.0 ± 37.3 *	2468.0 ± 372	0/6	223.8 ± 19.3	3305.3 ± 181.8 *	0/6
	316	251.5 ± 26.8 *	3127.7 ± 443.2 *	0/6			
	562	228.5 ± 18.2 *	3374.3 ± 121.9 *	0/6			
<i>Ternstroemia sylvatica</i> (pericarpio)	32	243.7 ± 47.2	2672.5 ± 142.9	0/6	257.3 ± 12.3	2537.0 ± 203.7	0/6
	56				247 ± 13.7	1892.8 ± 337.2	0/6
	100	412.3 ± 179.2	2847.0 ± 365.0	0/6	194.0 ± 19.1	2781.5 ± 327.4	0/6
	316	194.7 ± 24.5	2573.2 ± 78.7	0/6			
	562	199.3 ± 7.9	3167.3 ± 699.0 *	2/6			
<i>Ternstroemia sylvatica</i> (semillas)	3	227.3 ± 25.6	2928.5 ± 184.5	0/6			
	10	293.2 ± 82.1	3745.2 ± 331.6 *	0/6	308.0 ± 78.7	3589.7 ± 317.4 *	1/6
	18	204.0 ± 17.7	3251.5 ± 219.1 *	0/6			
	32	340.8 ± 22.4	#	6/6	239.0 ± 13.1	3502.7 ± 142.8 *	0/6
	56				356.2 ± 81.2	#	6/6
	100	745.7 ± 92.5 *	#	6/6	325.0 ± 34.8	#	6/6
Diacepam	Vehículo	232.5 ± 14.7	2178.3 ± 474.9	0/6			
	0.32	124.5 ± 4.4 *	3814.7 ± 512.3 *	0/6			
	1	168.5 ± 10.7 *	4410.3 ± 337.0 *	0/6			
	3.2	159.3 ± 8.6 *	6534.5 ± 151.8 *	0/6			
	5.6	135.2 ± 6.1 *	6652.6 ± 398.3 *	0/6			

\*Diferencia estadística significativa,  $P < 0.05$ , con respecto al control, después de un ANOVA de una vía seguida por una prueba de Dunnett.

**Cuadro A6.** Efecto del extracto acuoso de *T. pringlei* por vía i. p. sobre los parámetros hematológicos en rata.

Dosis (mg/kg)	Tiempo (min)			
	0	30	60	90
	Leucocitos, WBC ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )			
Vehículo	7.92 ± 0.42	6.72 ± 0.25	6.92 ± 0.46	6.14 ± 0.61
10	6.98 ± 0.33	6.52 ± 0.15	5.52 ± 0.67	5.8 ± 0.56
32	7.32 ± 0.3	6.69 ± 0.29	6.13 ± 0.31	5.59 ± 0.42
100	6.84 ± 0.6	5.66 ± 0.54	7.01 ± 0.45	6.54 ± 0.43
	Hematocrito, HCT (%)			
Vehículo	15.18 ± 0.53	13.16 ± 0.48	13.44 ± 0.7	12.25 ± 0.95
10	14.17 ± 0.45	12.97 ± 0.41	10.98 ± 1.08	11.44 ± 0.9
32	14.6 ± 0.47	13.92 ± 0.37	12.7 ± 0.62	11.84 ± 0.68
100	13.74 ± 1.39	11.54 ± 1.01	11.5 ± 1.22	10.33 ± 1.97
	Hemoglobina, HGB (g/dL)			
Vehículo	15.18 ± 0.53	13.16 ± 0.48	13.44 ± 0.7	12.25 ± 0.95
10	14.17 ± 0.45	12.97 ± 0.41	10.98 ± 1.08	11.44 ± 0.9
32	14.6 ± 0.47	13.92 ± 0.37	12.7 ± 0.62	11.84 ± 0.68
100	13.74 ± 1.39	11.54 ± 1.01	11.5 ± 1.22	10.33 ± 1.97
	Hemoglobina corpuscular media, MCH (pg)			
Vehículo	19.23 ± 0.42	19.56 ± 0.2	19.36 ± 0.23	20 ± 0.4
10	20.33 ± 0.33	19.9 ± 0.47	20.08 ± 0.57	19.86 ± 0.44
32	20.87 ± 0.4	20.86 ± 0.52	20.73 ± 0.05	21.32 ± 0.47
100	19.98 ± 0.43	20.5 ± 0.48	19.43 ± 0.13	20 ± 0.31
	Hemoglobina corpuscular media, MCHC (g/dL)			
Vehículo	19.23 ± 0.42	19.56 ± 0.2	19.36 ± 0.23	20 ± 0.4
10	20.33 ± 0.33	19.9 ± 0.47	20.08 ± 0.57	19.86 ± 0.44
32	20.87 ± 0.4	20.86 ± 0.52	20.73 ± 0.05	21.32 ± 0.47
100	19.98 ± 0.43	20.5 ± 0.48	19.43 ± 0.13	20 ± 0.31
	Volumen plaquetario medio, MPV (fl)			
Vehículo	7.35 ± 0.26	6.93 ± 0.14	7.3 ± 0.12	7 ± 0.1
10	6.97 ± 0.26	7.13 ± 0.38	7.53 ± 0.09	7.93 ± 0.87
32	7.27 ± 0.19	6.98 ± 0.2	7.4 ± 0.2	6.8 ± 0.11
100	7.6 ± 0.17	7.3 ± 0.21	6.65 ± 0.25	7.15 ± 0.55

\*Diferencia estadística significativa, P<0.05, con respecto al control, después de un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Bonferroni.

**Cuadro A7. Efecto del extracto acuoso de pericarpio de *T. sylvatica* por vía i.p. sobre los parámetros hematológicos en rata.**

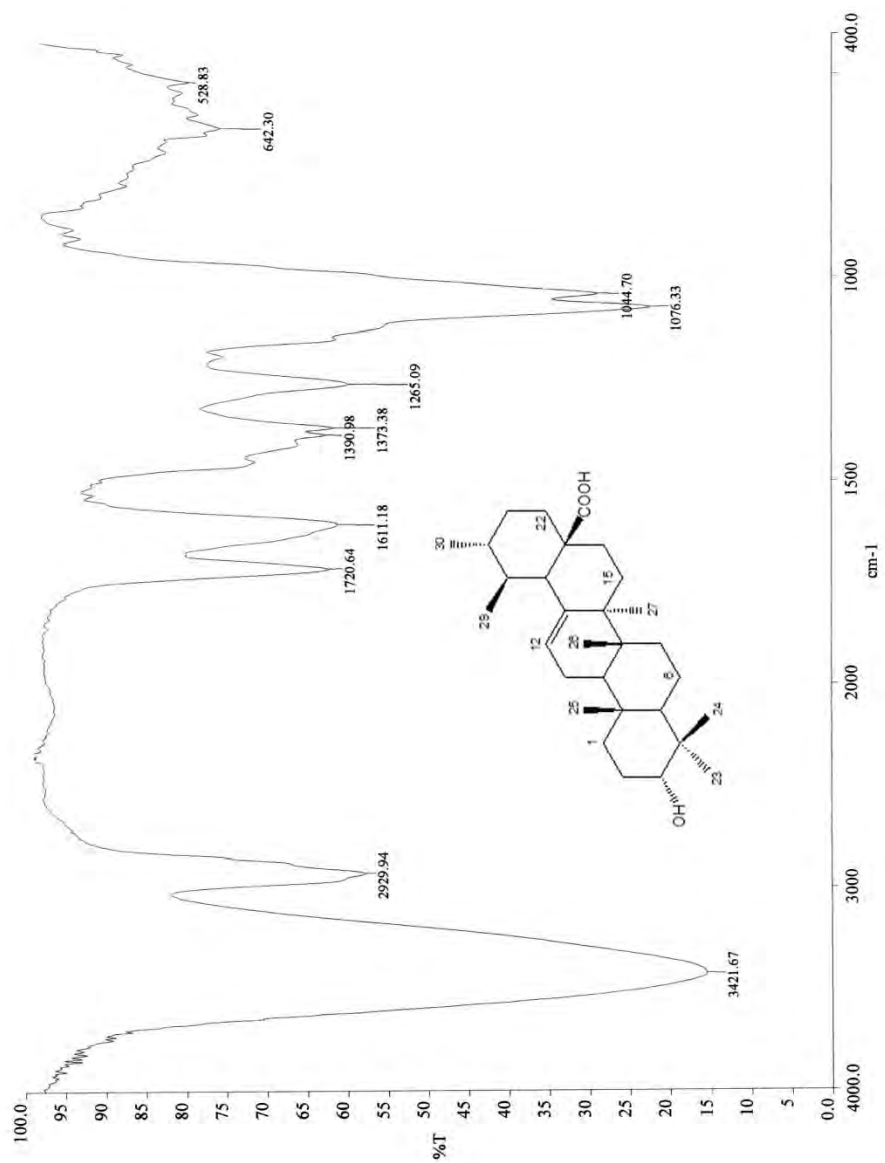
Dosis (mg/kg)	Tiempo (min)			
	0	30	60	90
	Globulos Rojos, RBC (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )			
Vehículo	7.92 ± 0.42	6.72 ± 0.25	6.92 ± 0.46	6.14 ± 0.61
10	6.92 ± 0.22	6.31 ± 0.35	6.55 ± 0.73	6.02 ± 0.73
32	7.38 ± 0.17	6.96 ± 0.52	5.53 ± 0.36	6.06 ± 0.31
100	7.23 ± 0.3	6.2 ± 0.6	5.93 ± 0.43	5.54 ± 0.55
	Hematocrito, HCT (%)			
Vehículo	15.18 ± 0.53	13.16 ± 0.48	13.44 ± 0.7	12.25 ± 0.95
10	13.76 ± 0.27	12.58 ± 0.65	12.9 ± 1.31	11.83 ± 1.36
32	14.86 ± 0.31	13.56 ± 0.73	10.87 ± 0.29	12.23 ± 0.55
100	14.6 ± 0.71	12.48 ± 1.02	11.83 ± 0.66	11.4 ± 0.67
	Volumen corpuscular medio, MCV (fl)			
Vehículo	771.25 ± 42.36	428.6 ± 153.99	498.6 ± 181.87	411 ± 340
10	549.6 ± 137.14	671.75 ± 88.17	285.2 ± 169.1	199.5 ± 160.12
32	738.6 ± 53.85	458.8 ± 163.98	168.33 ± 145.86	242 ± 187.36
100	816.25 ± 90.61	350 ± 201.89	424.25 ± 194.01	231.33 ± 180.87
	Concentración de hemoglobina corpuscular media, MCH (pg)			
Vehículo	19.23 ± 0.42	19.56 ± 0.2	19.36 ± 0.23	20 ± 0.4
10	19.92 ± 0.29	19.95 ± 0.37	19.8 ± 0.24	19.7 ± 0.38
32	20.16 ± 0.41	19.62 ± 0.49	19.77 ± 0.82	20.23 ± 0.39
100	20.15 ± 0.31	20.25 ± 0.56	19.7 ± 0.32	20.77 ± 0.88
	Volumen plaquetario medio, MPV (fl)			
Vehículo	7.35 ± 0.26	6.93 ± 0.14	7.3 ± 0.12	7 ± 0.1
10	7.18 ± 0.19	6.8 ± 0.04	6.53 ± 0.61	6.8 ± 0.0
32	7.2 ± 0.11	7.28 ± 0.11	7.5 ± 0.0	7.7 ± 0.7
100	7.35 ± 0.22	7.8 ± 0.1	8.27 ± 0.58	7.5 ± 0.0
	Leucocitos, WBC (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )			
Vehículo	9.65 ± 0.1	7.12 ± 1.01	7.12 ± 1.01	5.72 ± 0.74
10	7.76 ± 0.92	8.48 ± 1.63	8.48 ± 1.63	5.53 ± 1.92
32	7.08 ± 1.42	7.98 ± 1.82	7.98 ± 1.82	4.8 ± 1.71
100	9 ± 1.19	7.35 ± 1.25	7.35 ± 1.25	5.4 ± 0.76
	Hemoglobina, HGB (g/dl)			
Vehículo	15.18 ± 0.53	13.16 ± 0.48	13.44 ± 0.7	12.25 ± 0.95
10	13.76 ± 0.27	12.58 ± 0.65	12.9 ± 1.31	11.83 ± 1.36
32	14.86 ± 0.31	13.56 ± 0.73	10.87 ± 0.29	12.23 ± 0.55
100	14.6 ± 0.71	12.48 ± 1.02	11.83 ± 0.66	11.4 ± 0.67
	Hematocrito, HCT (%)			
Vehículo	47.9 ± 1.46	40.32 ± 1.95	40.32 ± 1.95	41.16 ± 1.94
10	42.96 ± 1.15	39.43 ± 1.78	39.43 ± 1.78	40.68 ± 4.42
32	44.98 ± 0.98	41.78 ± 2.41	41.78 ± 2.41	32.57 ± 1.16
100	43.8 ± 2.22	37.8 ± 3.87	37.8 ± 3.87	36.28 ± 1.84
	Plaquetas, PLT (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )			
Vehículo	771.25 ± 42.36	428.6 ± 153.99	498.6 ± 181.87	411 ± 340
10	549.6 ± 137.14	671.75 ± 88.17	285.2 ± 169.1	199.5 ± 160.12
32	738.6 ± 53.85	458.8 ± 163.98	168.33 ± 145.86	242 ± 187.36
100	816.25 ± 90.61	350 ± 201.89	424.25 ± 194.01	231.33 ± 180.87
	Concentración de hemoglobina corpuscular media, MCHC (g/dl)			
Vehículo	31.7 ± 0.33	32.7 ± 0.51	32.7 ± 0.51	32.64 ± 0.39
10	32.04 ± 0.26	31.85 ± 0.19	31.85 ± 0.19	31.82 ± 0.31
32	33.04 ± 0.31	32.5 ± 0.26	32.5 ± 0.26	33.4 ± 0.29
100	33.38 ± 0.34	33.25 ± 0.84	33.25 ± 0.84	32.58 ± 0.41

\*Diferencia estadística significativa, P<0.05, con respecto al control, después de un ANOVA de dos vías seguida por una prueba de Bonferroni.

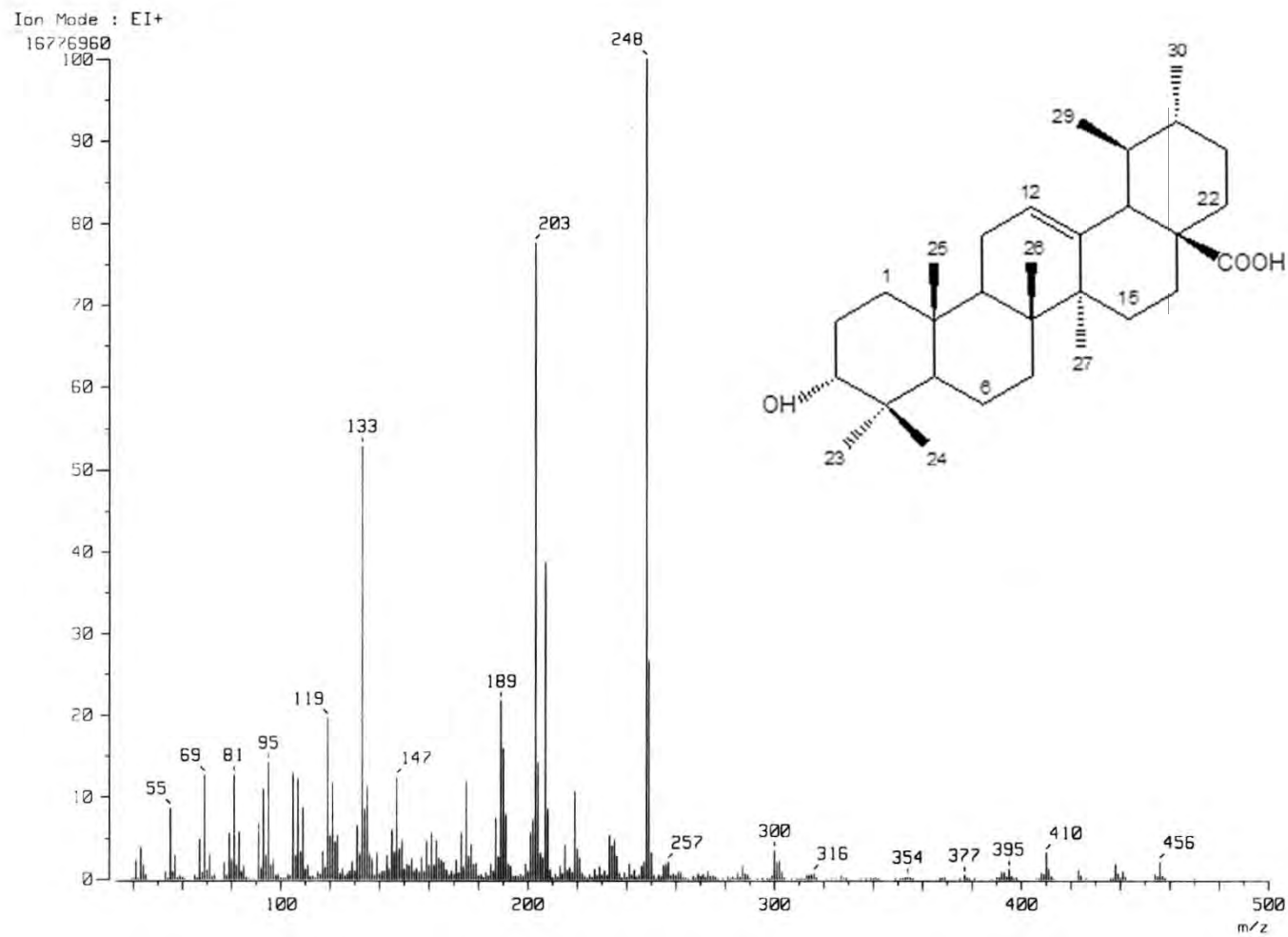




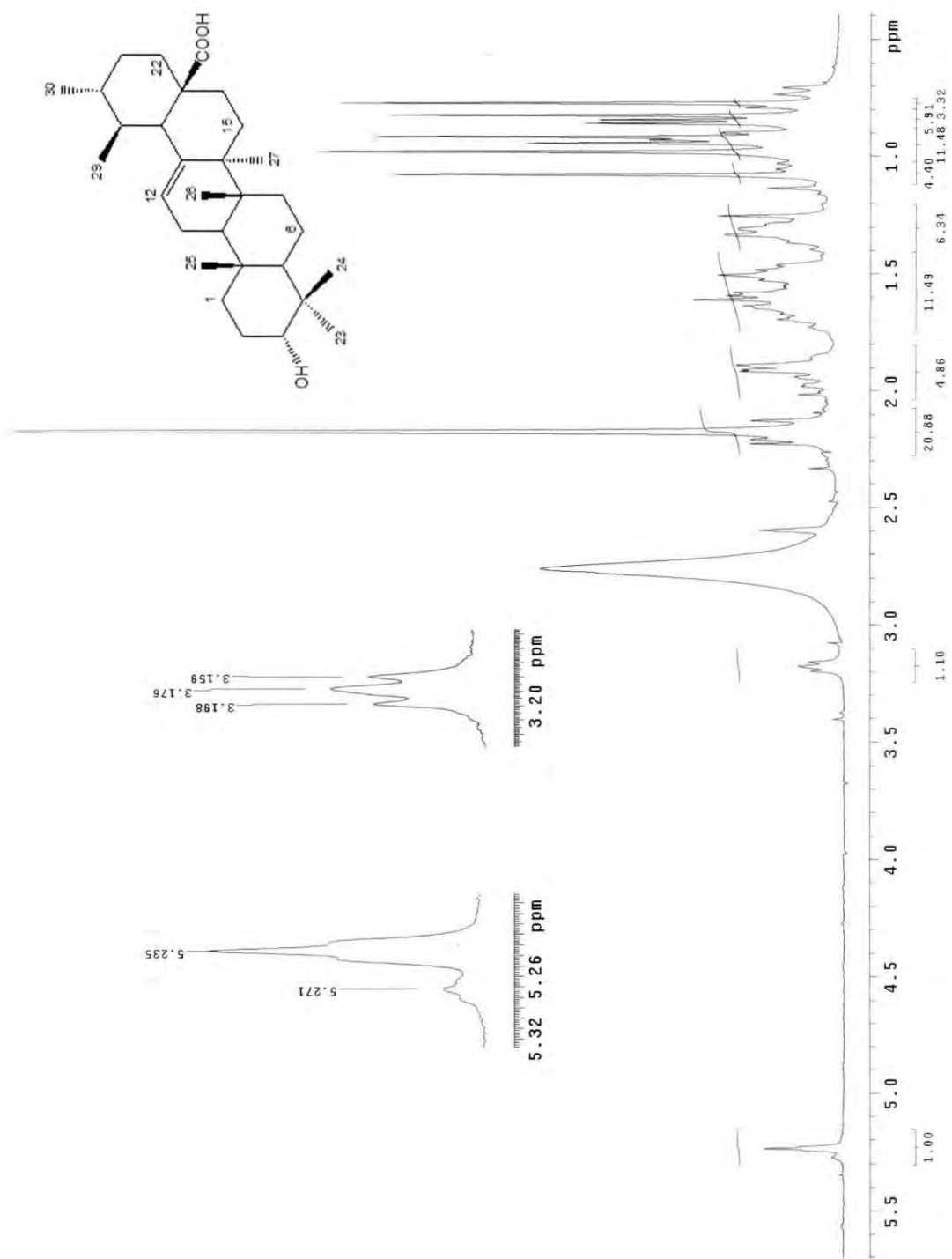
## ANEXO 2. ESPECTROS DE LAS SUSTANCIAS AISLADAS



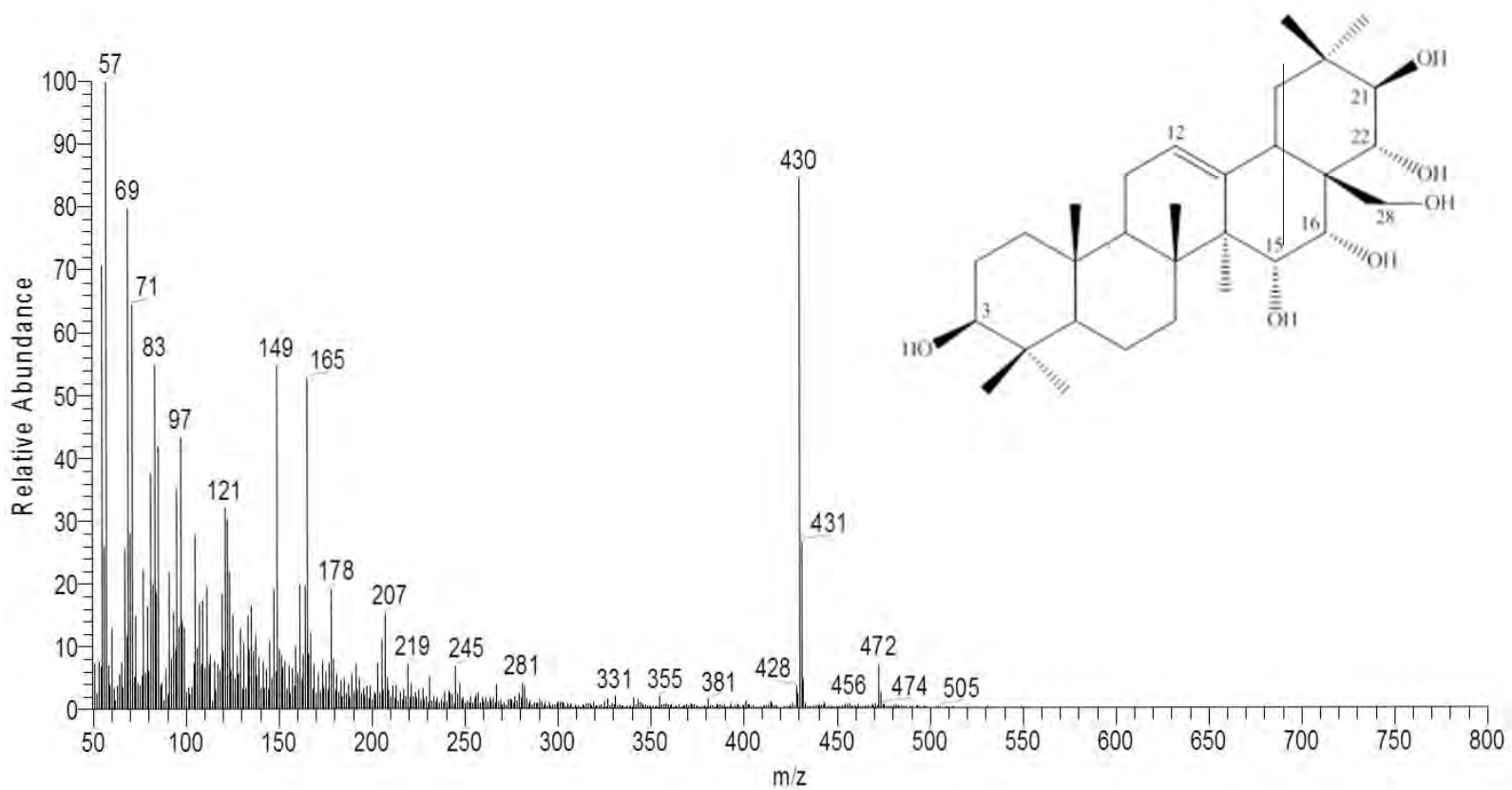
**Espectro 1.** Espectro de IR (película) del ácido 3-epi-ursólico.



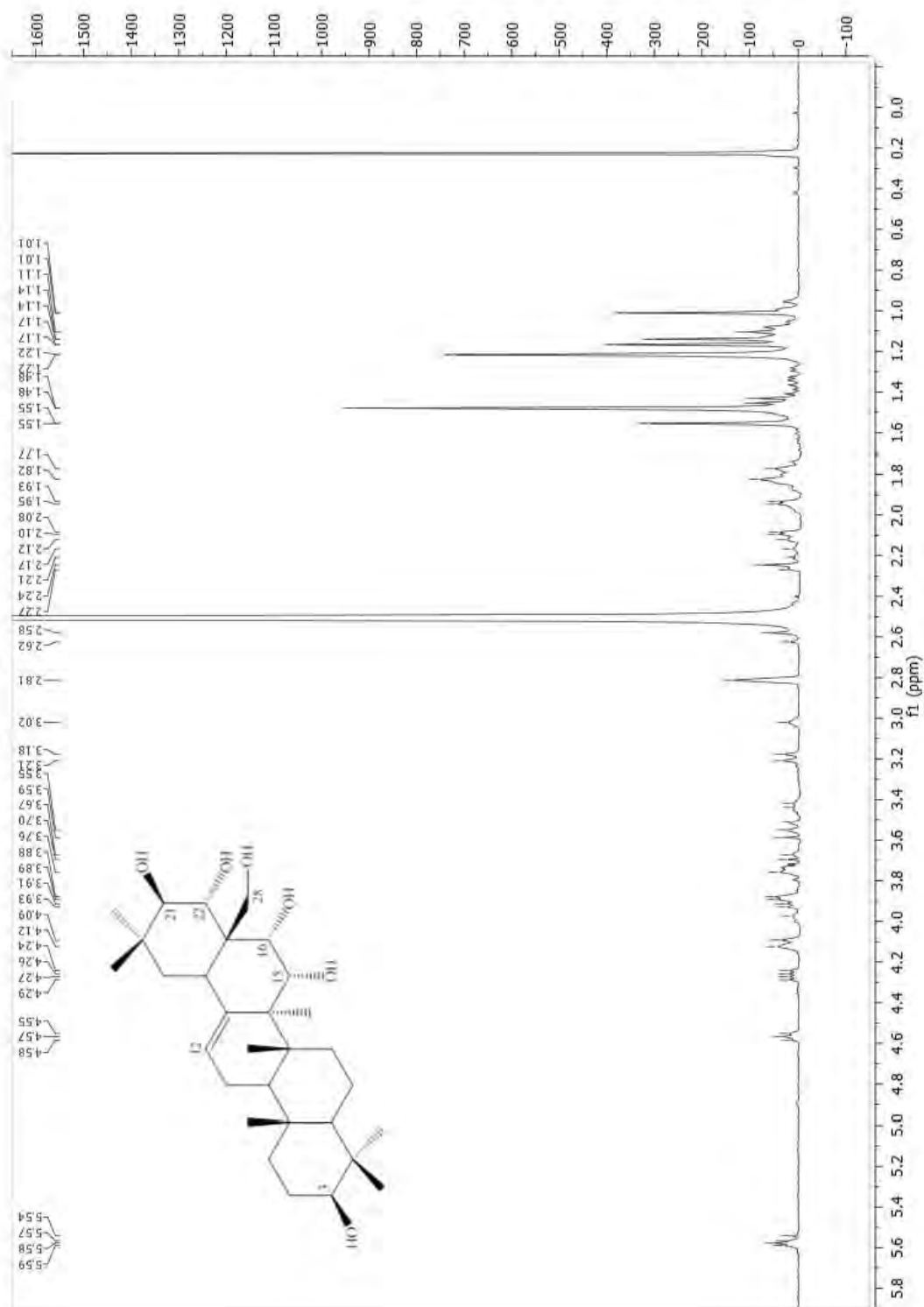
**Espectro 2.** Espectro EM (IE) del ácido 3-epi-ursólico.



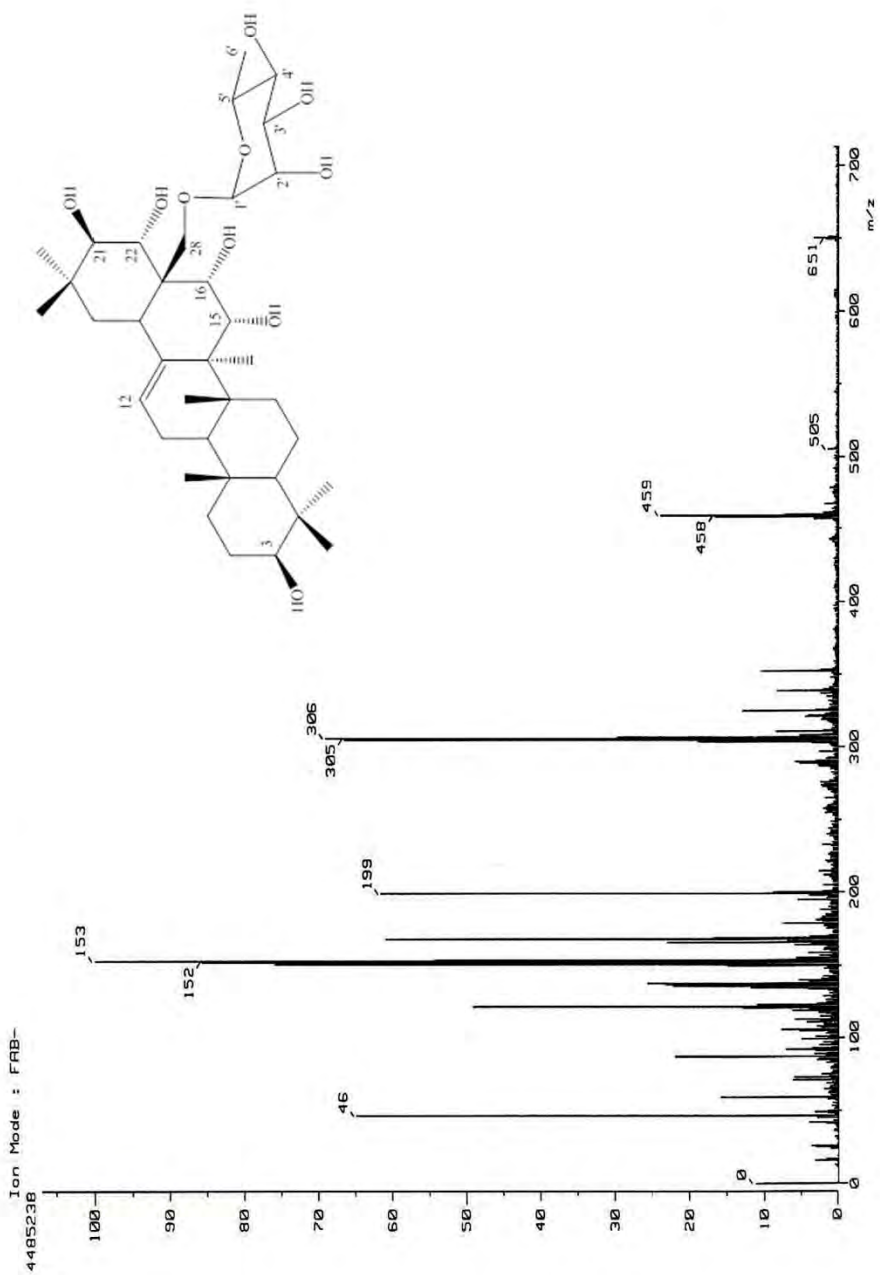
**Espectro 3.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del ácido 3-epi-ursólico.



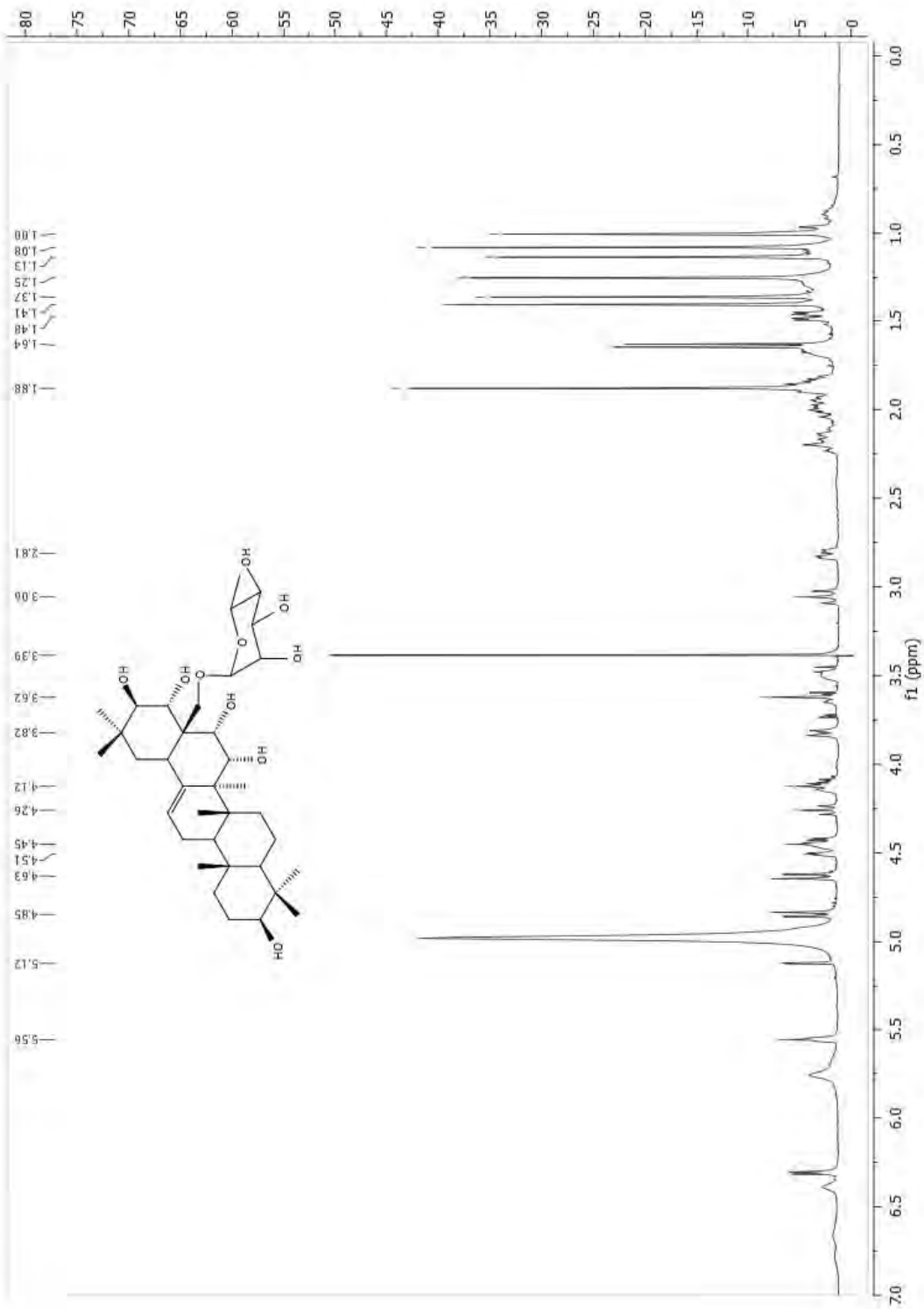
**Espectro 4.** Espectro EM (IE) del R<sub>1</sub>-barrigenol.



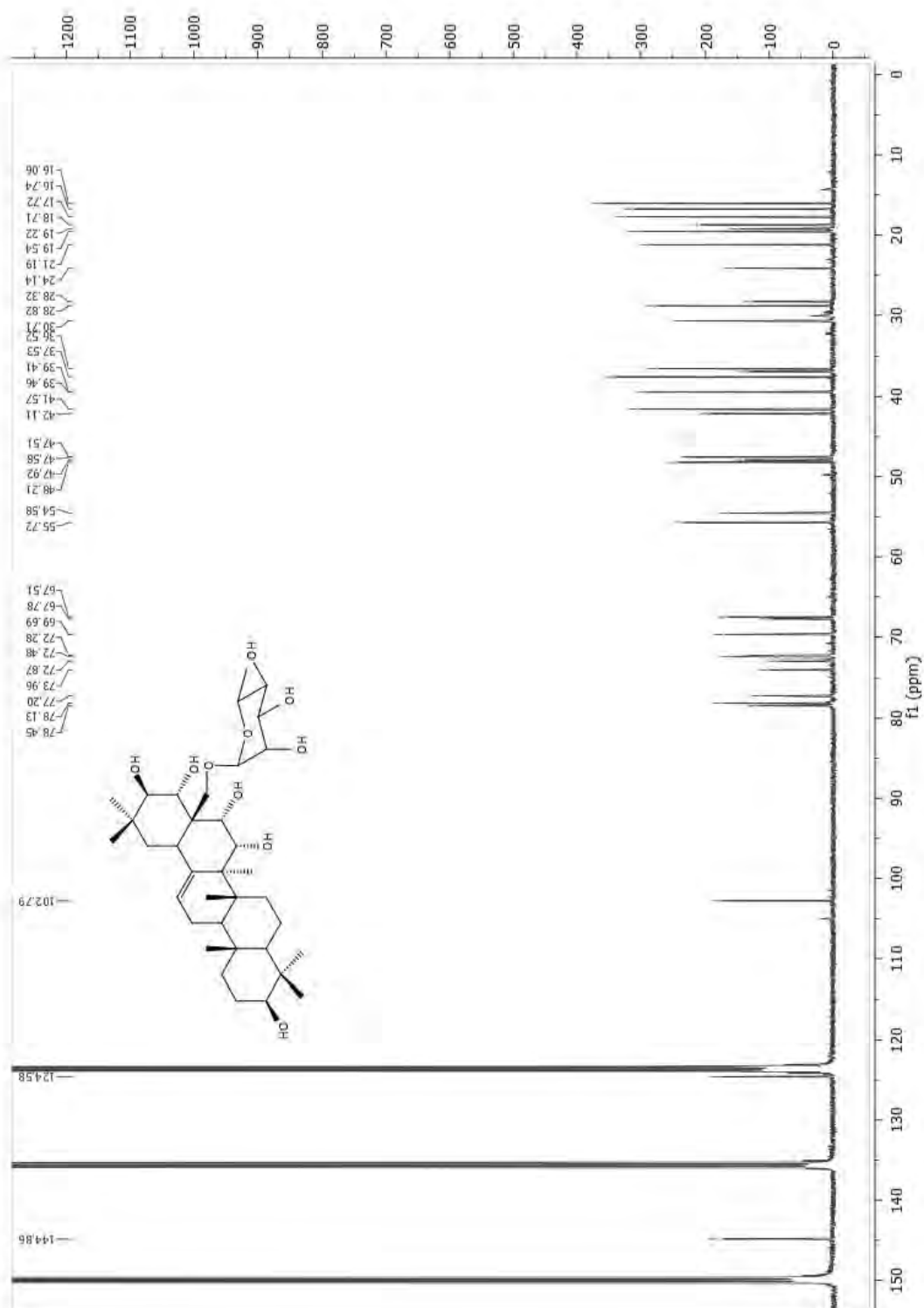
**Espectro 5.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, Py-d<sub>6</sub>) del R<sub>1</sub>-barrigenol.



**Espectro 6.** Espectro EM (FAB negativo) del 28-O- $[\beta$ -L-6-ramnopiranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol.

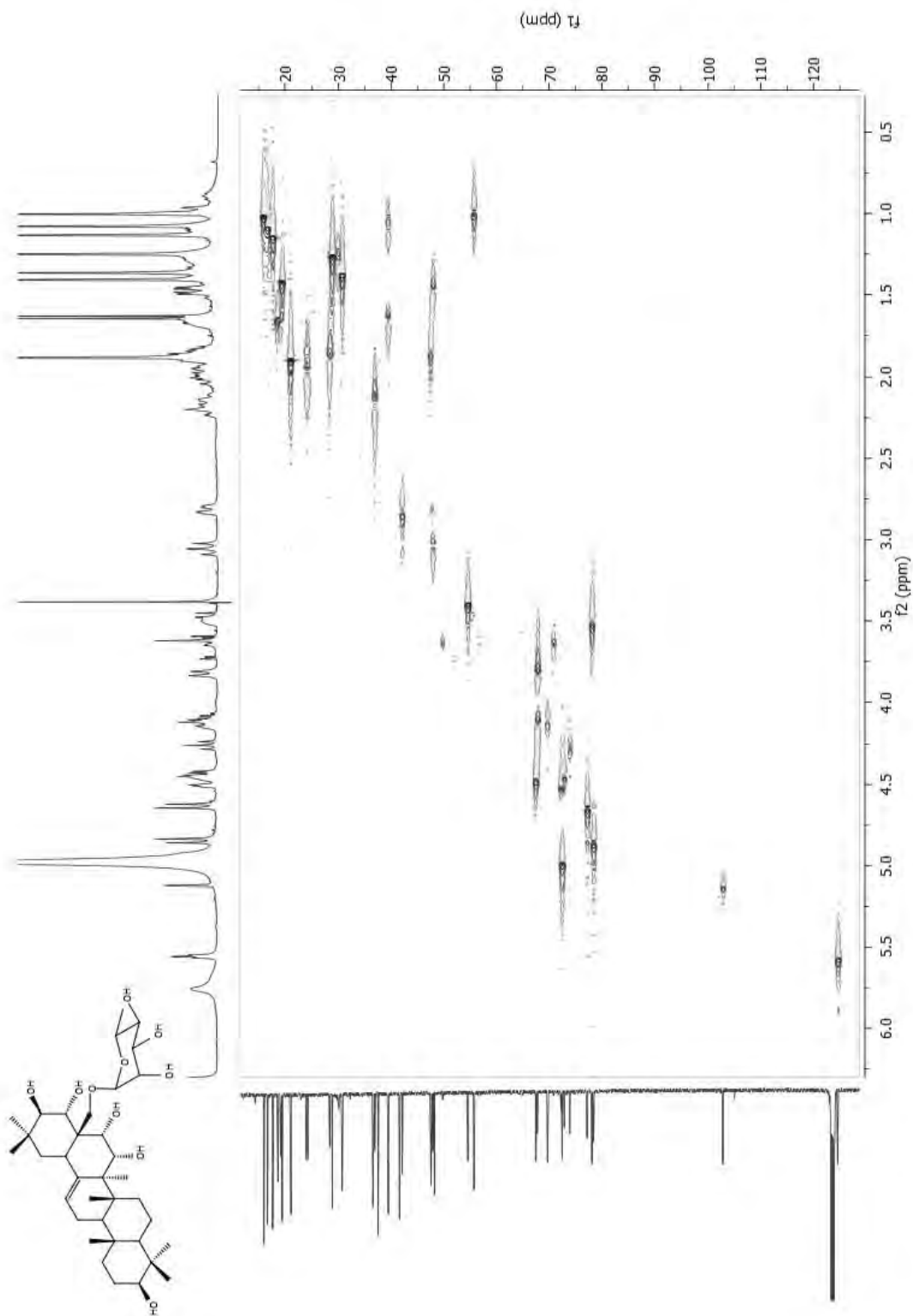


**Espectro 7.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, Py-d<sub>6</sub>) del 28-O-[β-L-6-ramnopiranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol.

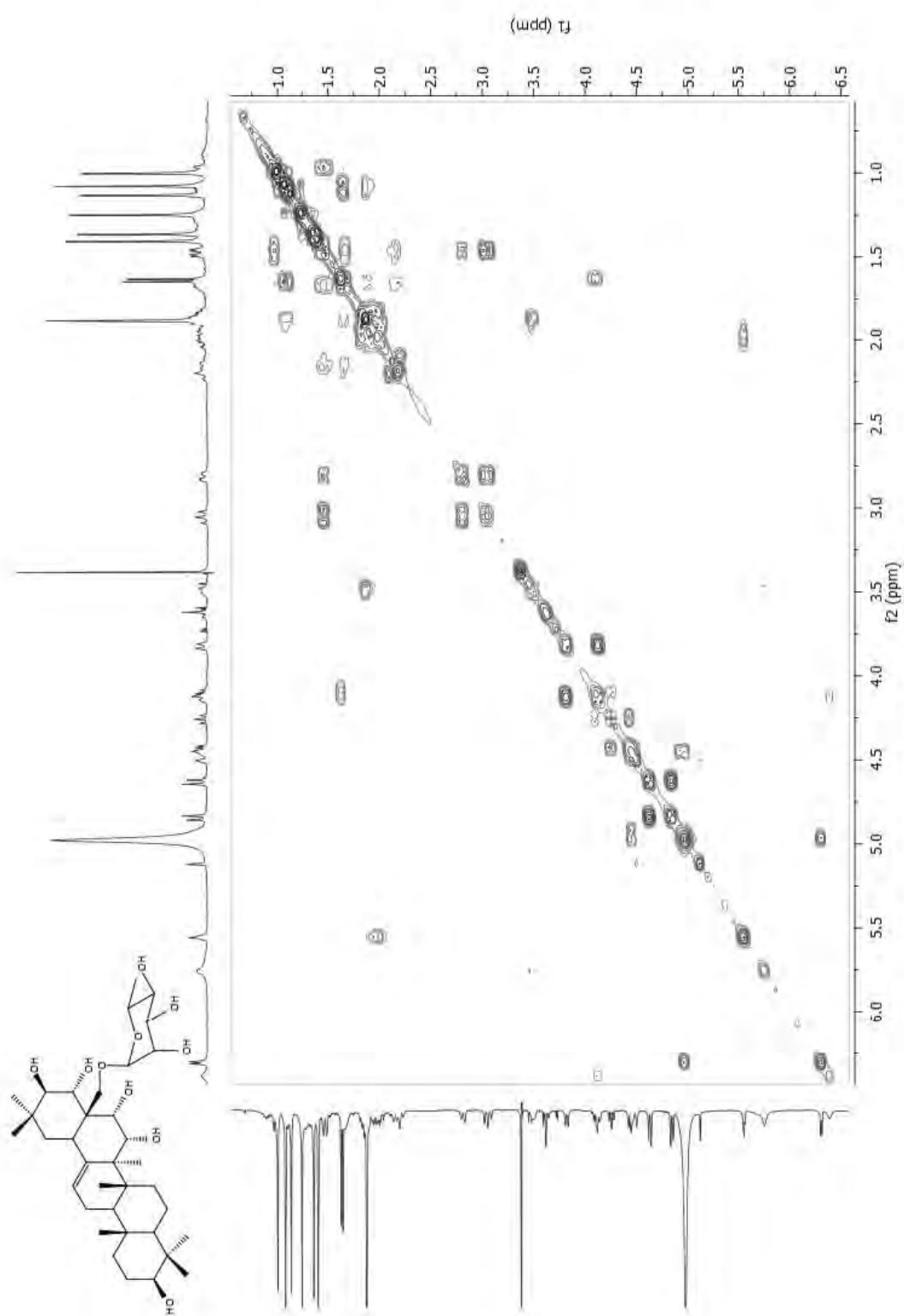


**Espectro 8.** Espectro de RMN<sup>13</sup>C (200 MHz, Py-d<sub>6</sub>) del 28-O-[[ $\beta$ -L-6-ramnopyranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol.

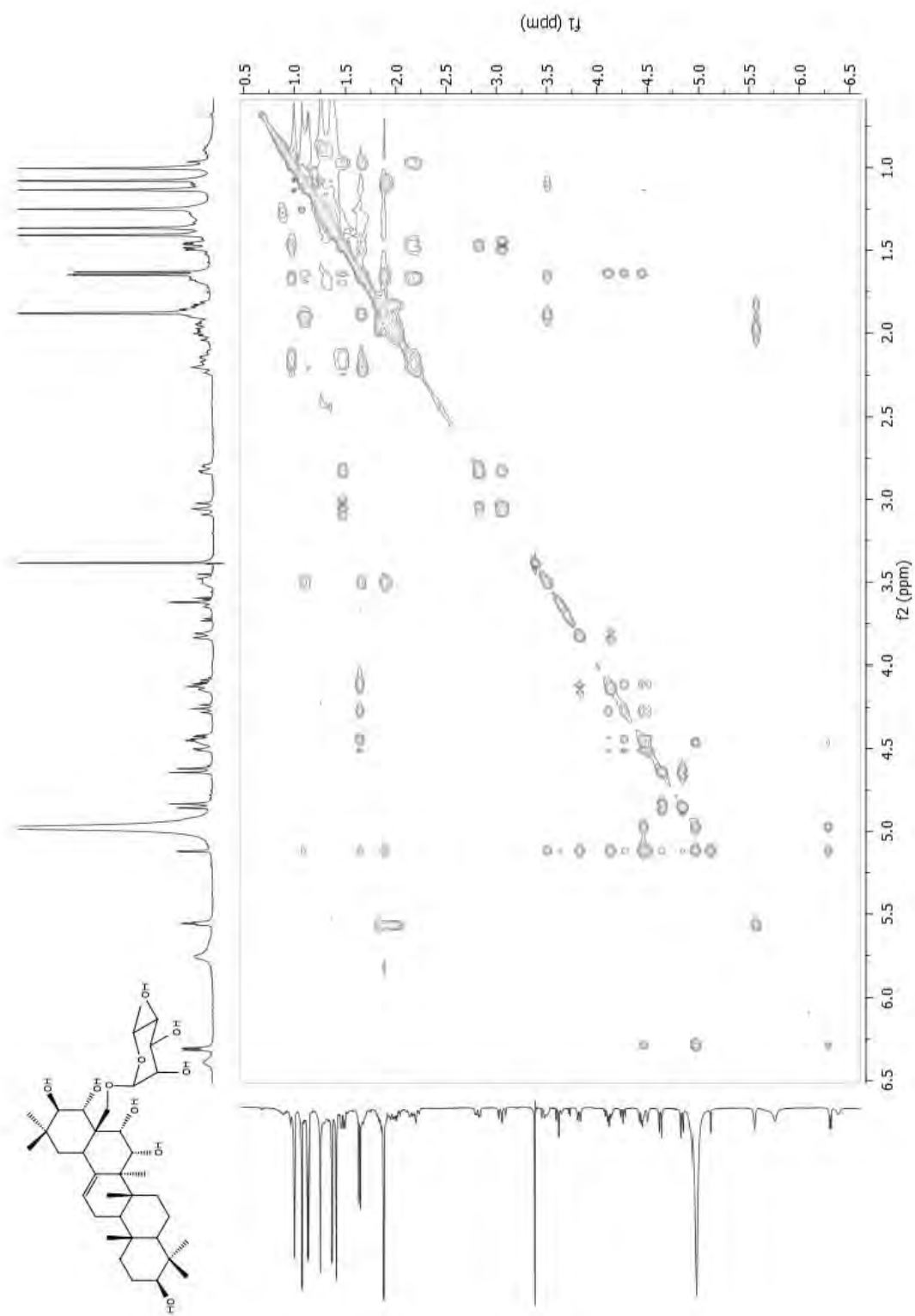




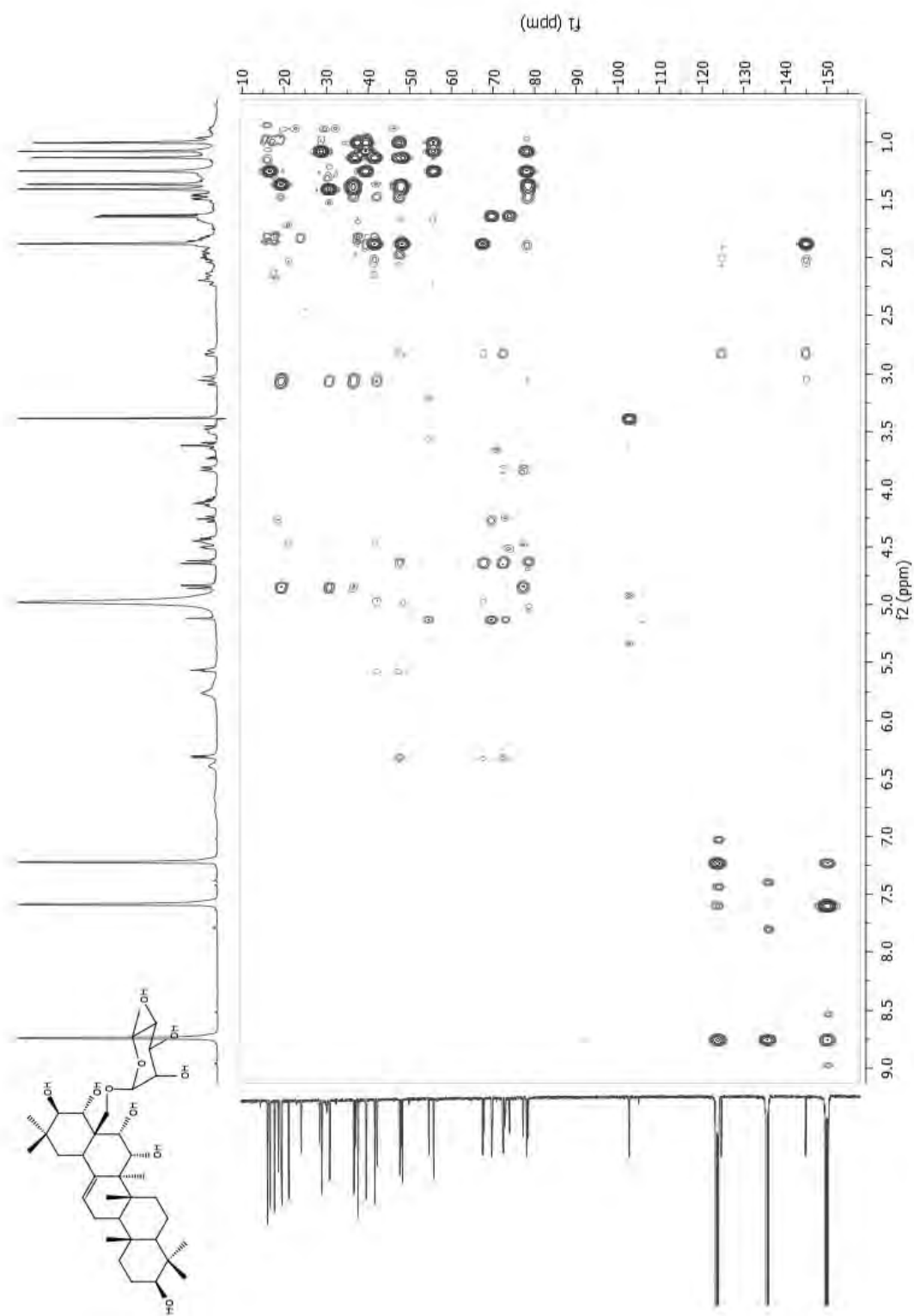
**Espectro 9.** Espectro del experimento de correlación heteronuclear HSQC del 28-O-[[β-L-6-ramnopiranosil]-R<sub>1</sub>]-barrigenol.



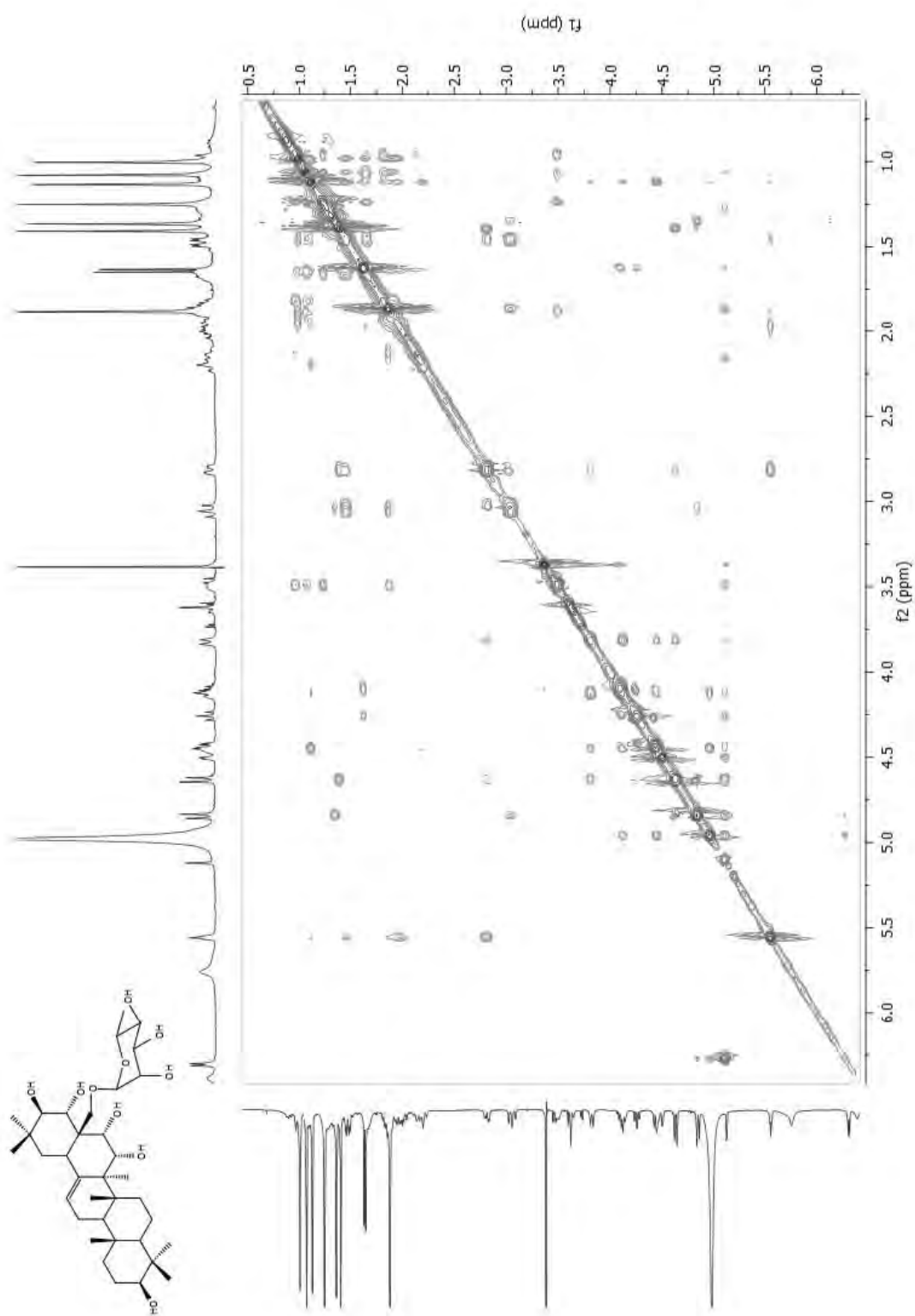
**Espectro 10.** Espectro del experimento de correlación homonuclear COSY del 28-O-[\beta-L-6-ramnopyranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol.



**Espectro 11.** Espectro del experimento de correlación homonuclear TOCSY del 28-O-[\beta-L-6-ramnopyranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol.



**Espectro 12.** Espectro del experimento de correlación heteronuclear HMBC del 28-O- $[\beta$ -L-6-ramnopyranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol.



**Espectro 13.** Espectro del experimento de correlación homonuclear NOESY del 28-O-[\beta-L-6-ramnopiranosil]-R<sub>1</sub>-barrigenol.

## **ANEXO 3. ARTÍCULOS PUBLICADOS**



## Pharmacodynamic interaction of the sedative effects of *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standl. with six central nervous system depressant drugs in mice<sup>☆</sup>

José Luis Balderas<sup>a</sup>, Victoria Reza<sup>a</sup>, Martha Ugalde<sup>a,b</sup>, Laura Guzmán<sup>a</sup>, Miriam Isabel Serrano<sup>a</sup>, Abigail Aguilar<sup>c</sup>, Andrés Navarrete<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F., México

<sup>b</sup> Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, J.C. Bonilla 66 y Calzada Ignacio Zaragoza, Colonia Ejército de Oriente, Iztapalapa 09230, México, D.F., México

<sup>c</sup> Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, Delegación Benito Juárez 06720, México, D.F., México

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 April 2008

Received in revised form 27 May 2008

Accepted 28 May 2008

Available online 6 June 2008

#### Keywords:

*Ternstroemia pringlei*

Theaceae

Isobolographic analysis

Sedative effect

CNS depressant drugs

Herb–drug interactions

### ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** The decoction of dried fruits of *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standl. (Theaceae), commonly known as “Flor de Tila”, is used in the Mexican traditional medicine to diminish insomnia and fear.

**Aim of the study:** To examine the sedative effects of the dried fruits of *Ternstroemia pringlei* and investigate a possible synergistic pharmacodynamic interaction between the sedative effect of aqueous extract of this plant and six central nervous system (CNS) depressant drugs.

**Materials and methods:** The sedative effect was performed using the exploratory cylinder test in ICR mice. The extracts and drugs were intraperitoneally administered 30 min before testing in different doses, with exception of ethanol and buspirone which were administered 5 and 20 min before testing, respectively. An isobolographic analysis was used to characterize the interaction between *Ternstroemia pringlei* extract and six CNS depressant drugs.

**Results:** The intraperitoneal administration of the hexane, dichloromethane, methanol and aqueous extracts of *Ternstroemia pringlei* showed a dose-dependent sedative effect. *Ternstroemia pringlei* aqueous extract combined with buspirone, diazepam, diphenhydramine, haloperidol or pentobarbital exerted a super-additive (synergistic) sedative interaction. Whereas the combination *Ternstroemia pringlei* extract plus ethanol resulted in a sub-additive (attenuate) sedative interaction.

**Conclusions:** These findings are in agreement with the traditional use of *Ternstroemia pringlei* in the treatment of insomnia, however it is a plant that interacts in a complex form with CNS depressant drugs. It may represent an advertence on the use of this plant concomitantly with other neuroactive drugs.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Ternstroemia* is the largest genus in the Theaceae family with an estimated 130 species worldwide. The species are distributed almost equally between the eastern and western hemispheres and are tropical and subtropical in distribution (Boom, 1989). The species of *Ternstroemia* are very frequent in the cloud forest, oak forest and pine-oak forest of the “Sierra Madre Oriental”, “Serranías Meridionales”, and “Serranías Transísmicas” of México with elevations above 1000 m over the sea (Alcántara et al., 2002). It has been reported that nine species occur in México (Boom, 1989;

Alcántara et al., 2002). Several species of *Ternstroemia* that grow in México, commonly known as “Flor de Tila”, are reputed to possess sedative, anxiolytic and anticonvulsant effects (Tortoriello and Romero, 1992; Aguilar-Santamaría and Tortoriello, 1996). Aqueous extracts of dried fruits of *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standl. synonym *Ternstroemia lineata* DC (Kobuski, 1942; Bartholomew and McVaugh, 1997) and *Ternstroemia sylvatica* Schltld. and Cham., which are the two major *Ternstroemia* species, are used as decoctions in the Mexican traditional medicine to diminish insomnia and fear (Molina et al., 1999). Pharmacological studies have showed that *Ternstroemia pringlei* (Aguilar-Santamaría and Tortoriello, 1996) and *Ternstroemia sylvatica* (Molina et al., 1999) produce sedative effects in rats. No chemical studies have been performed on these two species; however, from Asian species of *Ternstroemia* (principally *Ternstroemia japonica* and *Ternstroemia gymnanthera*) oleanane- and ursane-type triterpenoids, triterpenoid saponins,

<sup>☆</sup> Taken in part from the PhD work of J.L. Balderas.

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 5 622 52 91; fax: +52 55 5 622 53 29.

E-mail address: [anavarrt@servidor.unam.mx](mailto:anavarrt@servidor.unam.mx) (A. Navarrete).

carotenoids, monoterpenoids, tannins and other aromatic compounds have been identified (Kikuchi and Yamaguchi, 1974; Ikuta et al., 2003; Shin et al., 2003; Jo et al., 2005; Tori et al., 2005).

On the other hand, drug–drug interactions and drug–dietary supplements, including herb–drug interactions are emerging as important issues to consider in the evaluation of new drug candidates. However, herb–drug interaction studies are very limited (Fugh-Berman and Cott, 1999; Fugh-Berman and Ernst, 2001; Huang and Lesko, 2004). There is a dearth of well-documented data in this area and there are few studies that have specifically evaluated herb–drugs interactions (Rotblatt and Ziment, 2002).

Both preclinical and clinical studies of the drug interactions have been performed using the isobolographic analysis. This analysis offers a rigorous evaluation of the interactions between two drugs that act together to produce overtly similar effects (Tallarida, 2000). The effect of the combination may be a simple addition of the individual effects (additivity). In contrast, the effect of the combination can be exaggerated or even attenuated. The exaggerated effect is termed super-additive or synergistic, whereas the attenuated effect is termed sub-additive (Tallarida et al., 1997).

Several commercial products contain mixtures of the *Ternstroemia* species that grow in México, however there are no studies related to the potential interaction between these products and central nervous system (CNS) depressant drugs. Therefore in continuation with our studies on the potential pharmacological interaction between Mexican medicinal plants with reputed CNS depressant effect and commonly prescribed CNS depressant drugs (Ugalde et al., 2005), this study was designed to investigate a possible synergistic pharmacodynamic interaction between the sedative effect of aqueous extract of *Ternstroemia pringlei* and six CNS depressant drugs (diazepam, ethanol, pentobarbital, buspirone, haloperidol and diphenhydramine) by use of an isobolographic analysis in the exploratory cylinder test, a model to test sedative effect in mice (Ugalde et al., 2005; González-Trujano et al., 2006).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

The dried fruits of *Ternstroemia pringlei* were acquired from a local market (Mercado de Sonora, México City) in January 2004. The homogeneity and authenticity of the plant material were certified by one of the authors (A. Aguilar), botanist from the Herbarium of the Instituto Mexicano del Seguro Social. A sample was deposited in this herbarium with the voucher number IMSSN117.

### 2.2. Extraction and isolation

After grinding, using a manual miller, 443 g of fruits were extracted at room temperature with hexane ( $3 \times 2$  L, 24 h each), then with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 2$  L, 24 h each) and finally with MeOH ( $3 \times 2$  L, 24 h each); evaporation of the solvents in vacuum gave 0.94 g (0.21% yield), 2.1 g (0.47% yield) and 152.7 g (34.46% yield) of syrupy residues, respectively. Aqueous extract was prepared with 10 g of dried and powdered fruits by boiling in 90 ml of distilled water for 10 min. Afterwards, the extract was filtered by gravity and concentrated through air current at room temperature ( $22 \pm 2$  °C) obtaining 1.52 g (15.2% yield) of a breakable reddish solid.

### 2.3. Drugs

Haloperidol, diphenhydramine, buspirone and Tween 80 were purchased from Sigma Co. (Sigma St. Louis, MO). Absolute ethanol was of HPLC grade (Fisher Scientific). Sodium pentobarbital

(Anestesa<sup>TM</sup>) was purchased from Pfizer S.A. de C.V., México, as a pharmaceutical solution for veterinary use.

### 2.4. Animals

All experiments were performed on adult male ICR mice (25–34 g; Centro UNAM-Harlan, Harlan México, S.A. de C.V.). Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) adopted in our laboratory, and in compliance with international rules on care and use of laboratory animals.

The experimental groups consisted of six (interaction study) or ten animals (calculus of  $\text{ED}_{50}$  of individual drug). They were maintained at constant room temperature ( $22 \pm 2$  °C) and submitted to a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. All behavioral evaluations were carried out between 10:00 and 14:00 h.

Diazepam (Roche S.A.) and the organic extracts were suspended in 0.5% Tween 80 in saline solutions, all other compounds, including the aqueous extract, were dissolved in saline solution (0.9%). The drugs were freshly prepared each time and intraperitoneally injected in a volume of 0.1 ml/10 g body weight. Control animals received the same volume of vehicle (0.5% Tween 80 in saline or saline solution only).

### 2.5. Procedure

The apparatus consisted of a glass cylinder (30 cm in height, 11 cm in diameter, with wall of 3 mm). The cylinder is placed on filter paper in a room with constant lighting and isolated from external noise (Hiller and Zetler, 1996; Oliva et al., 2004; Ugalde et al., 2005).

An individual naïve mouse was put on the filter paper-covered floor of the glass cylinder; the number of rears performed over a 5-min period was recorded. The inner side of the apparatus and floor were cleaned with alcoholic solution and filter paper was changed between each animal test session (Oliva et al., 2004). The crude organic and aqueous extracts were tested for activity at different doses (10–1000 mg/kg i.p.) in the exploratory cylinder assay. The aqueous extract showed the major sedative activity. Therefore, the aqueous extract was used in the interaction study and it was freshly prepared each time in the same day of the experimentation. The aqueous extract and drugs were administered 30 min before testing in different doses, with exception of ethanol and buspirone which were administered 5 and 20 min before testing, respectively (Ugalde et al., 2005). When drugs were given in combination, aqueous extracts were injected first in the right side of the peritoneum, followed by the injection of the test drug in the left side. When only one of the drugs was given, the missing drug injection was substituted with the injection vehicle. During observation, the experimenter stood next to the apparatus always at the same place. The observations were made without prior knowledge of the experimental conditions applied to the animal. Reduced exploratory rearing showed by naïve mice after placement in an unfamiliar environment reveals a sedative effect (Rolland et al., 1991; Hiller and Zetler, 1996; Oliva et al., 2004).

Dose–response curves were constructed to assess the sedative effect of *Ternstroemia pringlei* extracts and the other CNS depressant drugs using ten animals at each of at least five doses. The ranges of doses used of the CNS depressant drugs were: diazepam (0.3–7.5 mg/kg), ethanol (1000–4000 mg/kg), pentobarbital (2.5–40 mg/kg), buspirone (0.15–10 mg/kg), haloperidol (0.1–3 mg/kg) and diphenhydramine (10–25 mg/kg). The dose that produced 50% of sedation ( $\text{ED}_{50}$ , 50% of reduction in the rears



**Table 1**  
ED<sub>50</sub> values and 95% confidence limits of the sedative effect induced by *Ternstroemia pringlei* extracts and different central nervous system depressant drugs in mice

Drug	ED <sub>50</sub> (mg/kg, i.p.)	CL 95%
Hexane extract	446.68	307.70–648.3
Dichloromethane extract	345.93	150.20–795.6
Methanol extract	232.80	178.40–304.1
Aqueous extract	77.58	50.21–124.1
Buspirone	1.04	0.73–1.46
Diazepam	1.22	0.97–1.49
Diphenhydramine	17.05	15.70–18.53
Ethanol	1938.83	1617.65–2323.77
Haloperidol	0.42	0.30–0.55
Pentobarbital	11.86	10.53–13.34

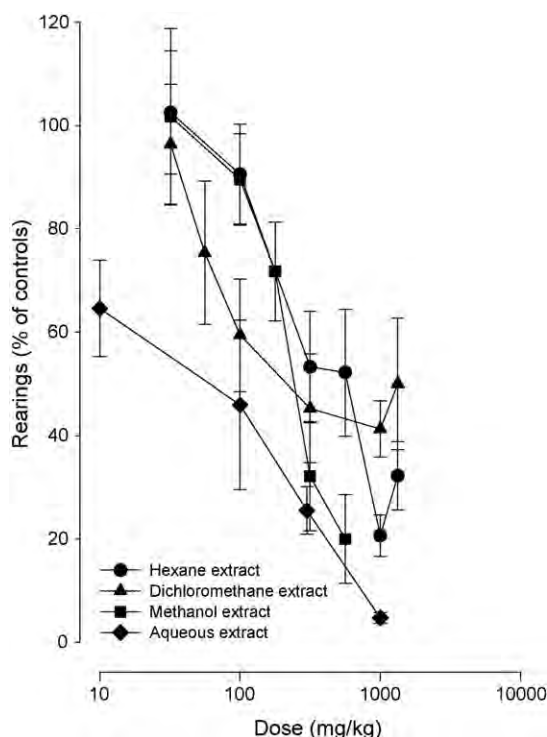
number with respect to control group) and its associated 95% confidence intervals were calculated using standard linear regression analysis of the log dose–response (Tallarida, 2000).

2.6. Analysis of the interaction

An isobolographic analysis was performed to characterize the interaction between *Ternstroemia pringlei* extract with diazepam, ethanol, pentobarbital, buspirone, haloperidol and diphenhydramine. The theoretical additive doses ( $Z_{add}$ ) with their S.E.M. for each combination in the same component ratio (1:1) were computed from the median effective doses (ED<sub>50</sub>) of the single drugs, according to the method described by Tallarida (1992) to satisfy the equation:

$$Z_{add} = fA + (1 - f)B$$

where  $A$  was the ED<sub>50</sub> of *Ternstroemia pringlei* extract and  $B$  was the ED<sub>50</sub> of the CNS depressant drug. For a 1:1 fixed ratio,  $f$  in this case was 0.5 and  $(1 - f)$  was also 0.5. The value  $fA = a$  represents the fraction of the ED<sub>50</sub> of the *Ternstroemia pringlei* extract in the combination and  $(1 - f)B = b$  represents the fraction of ED<sub>50</sub> of the CNS depressant drug in the combination (Tallarida, 2000).  $Z_{add}$  represents a total additive dose of the drugs, theoretically providing a 50% of reduction in the rear number with respect to the control group.  $Z_{exp}$  is an experimentally determined total dose of a mixture of two component drugs, which was administered at a 1:1 fixed-ratio combination sufficient to reduce the number of rearings by 50% with respect to the control group. The  $Z_{exp}$  values (with their 95% confidence limits) were determined from the respective drug–dose effect curves of combined drugs, according to standard linear regression analysis of the log dose–response curve (Tallarida, 2000), and subsequently, the 95% confidence limits were transformed into S.E.M. Experimentally determined  $Z_{exp}$  was statistically compared with the theoretically calculated  $Z_{add}$  doses with the use of Student's  $t$ -test, according to procedures previously described by



**Fig. 1.** Dose–response curves plotting % of rearing with respect to its control represented on the y-axis for the sedative effect of hexane, dichloromethane, methanol and aqueous extracts of *Ternstroemia pringlei* fruits. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 10 mice. Doses (mg/kg) are represented logarithmically on the x-axis.

Tallarida et al. (1989), who has proposed the use of this statistical test for analyzing the data in isobolography.  $Z_{exp}$  values that were lower than  $Z_{add}$  value, with a  $p < 0.05$  for the differences in both the X and Y directions, were interpreted as a significant super-additive interaction. Values of  $Z_{exp}$  that were higher than  $Z_{add}$  values, with a  $p < 0.05$  for the differences in both the X and Y directions, were interpreted as a significant sub-additive interaction. When there were no statistical differences between the values  $Z_{exp}$  and  $Z_{add}$ , this was interpreted as no interaction and an additive relationship (additivity) was established in the combination (Tallarida, 2000).

Graphical representation of the observed interactions in the shape of isoboles (iso-effect curves or isobologram), which is a simple form of visualization of interactions, facilitated the interpretation of interactions between *Ternstroemia pringlei* extract and each CNS depressant drug studied. The isobologram was constructed by connecting the ED<sub>50</sub> of *Ternstroemia pringlei* extract on the abscissa with ED<sub>50</sub> of the combined CNS depressant drug on the

**Table 2**  
Theoretical ( $Z_{add}$ ) and experimental ( $Z_{exp}$ ) ED<sub>50</sub> values  $\pm$  S.E.M. for combinations of *Ternstroemia pringlei* aqueous extract with central nervous system depressant drugs and magnitude of the interaction values

Combination	$Z_{add}$ (mg/kg)	$Z_{exp}$ (mg/kg)	Magnitude of the interaction <sup>c</sup>
<i>Ternstroemia pringlei</i> extract:buspirone	39.31 $\pm$ 5.82	20.85 $\pm$ 5.38 <sup>a</sup>	0.52 <sup>d</sup>
<i>Ternstroemia pringlei</i> extract:diazepam	39.40 $\pm$ 5.82	22.76 $\pm$ 3.61 <sup>a</sup>	0.57 <sup>d</sup>
<i>Ternstroemia pringlei</i> extract:diphenhydramine	47.32 $\pm$ 5.83	20.65 $\pm$ 1.98 <sup>a</sup>	0.43 <sup>d</sup>
<i>Ternstroemia pringlei</i> extract:ethanol	1008.21 $\pm$ 63.45	1938.83 $\pm$ 167.96 <sup>b</sup>	1.92 <sup>e</sup>
<i>Ternstroemia pringlei</i> extract:haloperidol	39.00 $\pm$ 5.82	16.33 $\pm$ 1.21 <sup>a</sup>	0.41 <sup>d</sup>
<i>Ternstroemia pringlei</i> extract:pentobarbital	44.72 $\pm$ 5.83	21.06 $\pm$ 2.40 <sup>a</sup>	0.44 <sup>d</sup>

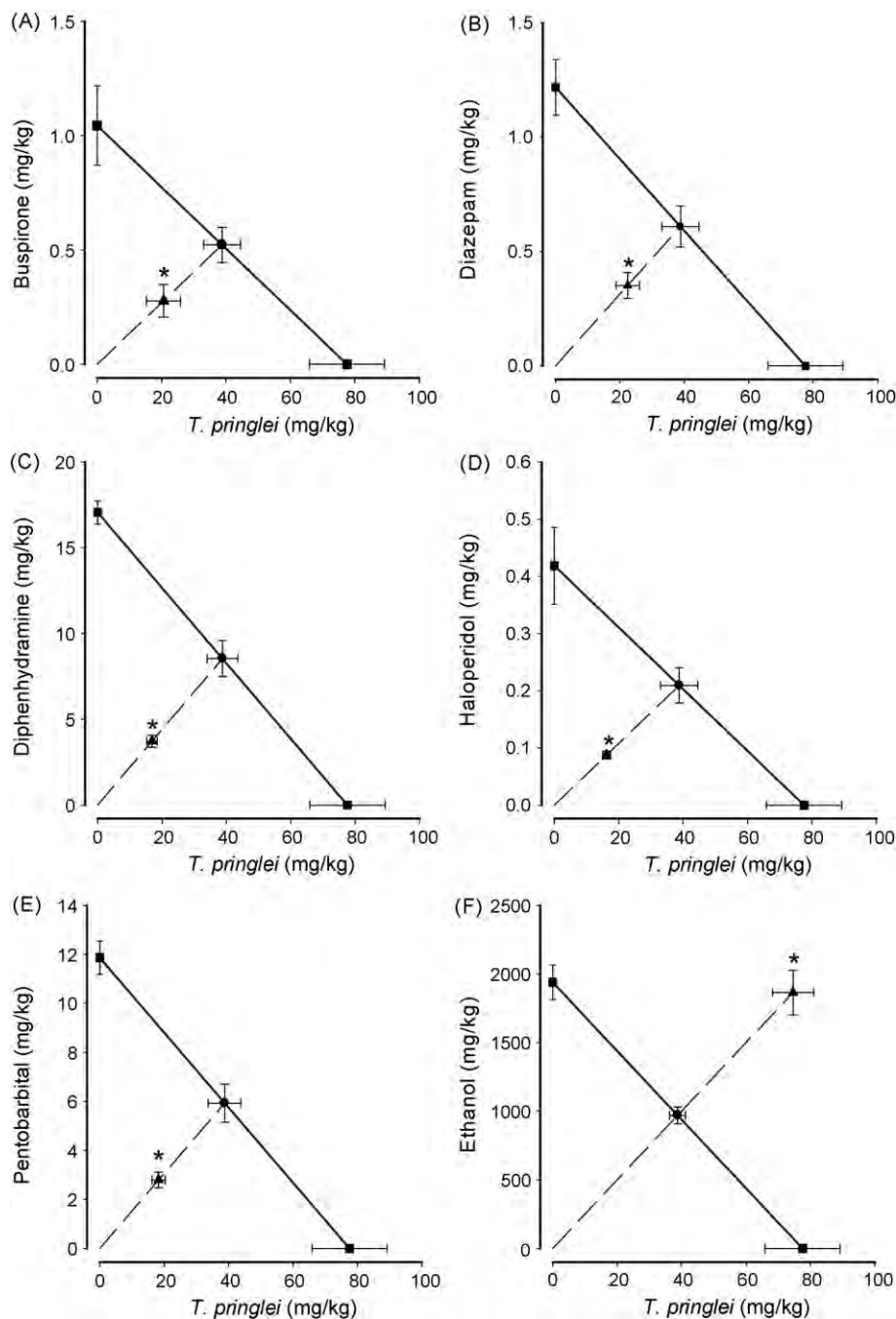
<sup>a</sup>  $Z_{exp}$  value was statistically lower than  $Z_{add}$  value with a  $p < 0.05$ .

<sup>b</sup>  $Z_{exp}$  value was statistically higher than  $Z_{add}$  value with a  $p < 0.05$ .

<sup>c</sup> According to the relation:  $a/A + b/B$ , (see Section 2).

<sup>d</sup> Super-additive interaction  $a/A + b/B$  was statistically  $< 1.0$  ( $p < 0.05$ ).

<sup>e</sup> Sub-additive interaction  $a/A + b/B$  was statistically  $> 1.0$  ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 2.** Isobolograms for the intraperitoneal co-administration of *Ternstroemia pringlei* aqueous extract with central nervous system depressant drugs. (A) *Ternstroemia pringlei*:buspirone; (B) *Ternstroemia pringlei*:diazepam; (C) *Ternstroemia pringlei*:diphenhydramine; (D) *Ternstroemia pringlei*:ethanol; (E) *Ternstroemia pringlei*:haloperidol; (F) *Ternstroemia pringlei*:pentobarbital. The individual  $ED_{50}$  values in each combination (■), the theoretical calculated  $ED_{50}$  for an additive effect ( $Z_{add}$ ) in a fixed ratio 1:1 (●), and the experimentally found  $ED_{50}$  values ( $Z_{exp}$ , ▲) are represented in the graphs. Horizontal and vertical bars indicate S.E.M. The values of  $Z_{exp}$  were close to  $Z_{add}$ , indicating an additive relationship for all the combinations studied.

ordinate to obtain the additivity line (Tallarida, 2000). The amounts of each component in combination (experimental ( $Z_{exp}$ ) and theoretical additive ( $Z_{add}$ ) doses) were also plotted in the same graph. The theoretical additive point lies on a line connecting the  $ED_{50}$  values of the individual drugs. Experimental values that lie below and to the left of this additive line are considered to be synergistic or super-additive, whereas values that lie above and to the right of the line demonstrate an attenuated or sub-additive interaction.

To obtain a value describing of the magnitude of the interaction, a fractional analysis was performed for each combination, using the

$ED_{50}$  of the *Ternstroemia pringlei* extract, the CNS depressant drug and their combination according to:

$$\frac{a}{A} + \frac{b}{B}$$

where  $A$  and  $B$  are the  $ED_{50}$  when each drug (*Ternstroemia pringlei* extract and CNS depressant drug) acts alone and  $a$  and  $b$  are the amounts when each drug acts in the combination. These total fraction values measure the divergence between the experimental dose ( $Z_{exp}$ ) of the combination and the theoretical ( $Z_{add}$ )

additive dose (Tallarida, 2000). Statistical difference demonstration ( $p < 0.05$ ) of 1 for the relation  $a/A + b/B$  was interpreted as super-additive interaction if  $a/A + b/B$  was  $< 1.0$  and as sub-additive interaction if  $a/A + b/B$  was  $> 1.0$ ; the absence of a statistical difference ( $p > 0.05$ ) was interpreted as additive effect (Tallarida, 2000).

### 3. Results

Intraperitoneal administration of the organic and aqueous extracts of *Ternstroemia pringlei* fruits resulted in a dose-dependent decrease of the number of rearings in the exploratory cylinder model (Fig. 1). The order of sedative effect for these extracts was ( $ED_{50}$ ): aqueous (77.58 mg/kg) > methanol (232.80 mg/kg) > dichloromethane (345.93 mg/kg) > hexane (446.68 mg/kg). The CNS depressant drugs also showed a dose-dependent sedative effect in this model. The values of the effective dose 50 ( $ED_{50}$ ) and 95% confidence limits ( $CL_{95}$ ) for *Ternstroemia pringlei* extracts and the other drugs appear in Table 1. The interaction study between this plant and the CNS depressant drugs was performed only with the aqueous extract since it was the most active sedative extract. All drug combinations were applied at dose-fixed ratios of 1:1. Theoretical ( $Z_{add}$ ) and experimental ( $Z_{exp}$ )  $ED_{50}$  values for each combination tested are given in Table 2. The  $Z_{exp}$  values when *Ternstroemia pringlei* aqueous extract was simultaneously administered with buspirone, diazepam, diphenhydramine, haloperidol or pentobarbital were statistically lower ( $p < 0.05$ ) than  $Z_{add}$  value. In addition, the fractional analysis for these combinations demonstrated that the relation  $a/A + b/B$  was statistically  $< 1.0$  ( $p < 0.05$ ), indicating a super-additive or synergistic interaction for each one of these combinations (Table 2). In contrast, for the simultaneous injection of *Ternstroemia pringlei* aqueous extract plus ethanol the  $Z_{exp}$  value (1938.83 mg/kg) was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than the  $Z_{add}$  value (1008.21 mg/kg) and the relation  $a/A + b/B$  was statistically  $> 1.0$  ( $p < 0.05$ ), indicating a sub-additive interaction for this combination (Table 2).

The isobolograms of the simultaneous injection of *Ternstroemia pringlei* aqueous extract + buspirone (Fig. 2A), *Ternstroemia pringlei* aqueous extract + diazepam (Fig. 2B), *Ternstroemia pringlei* aqueous extract + diphenhydramine (Fig. 2C), *Ternstroemia pringlei* aqueous extract + haloperidol (Fig. 2D) and *Ternstroemia pringlei* aqueous extract + pentobarbital (Fig. 2E) depict also a super-additive interaction because the experimental points lay below the additive line (Tallarida, 2000). Whereas the combination *Ternstroemia pringlei* aqueous extract + ethanol gave an experimental point lying in the sub-additive region (Fig. 2F) and the sub-additive interaction was statistically demonstrated ( $p < 0.05$ ) based on the comparison of theoretical and experimental data as stated above.

From the methanol extract of *Ternstroemia pringlei* a white amorphous powder was spontaneously precipitated (mp 243–245 °C); after crystallization from a methanol/hexane mixture) that was identified as *epi*-ursolic acid by comparison of their IR (film) and proton NMR (400 MHz,  $CDCl_3 + DMSO-d_6$ ) spectroscopy and MS (EI) data with those reported for this triterpene (Mukherjee et al., 1982; Jo et al., 2005). This compound was suspended in 0.5% Tween 80 in saline solutions and tested at 100 mg/kg, i.p. in the exploratory cylinder model in mice ( $n = 8$ ), however it did not show sedative effect.

### 4. Discussion

The present study revealed clearly that *Ternstroemia pringlei* extracts exerted sedative effect. The activity of the extracts was increasing with the polarity of the solvents used to prepare such extracts, the aqueous extract being the most active of them with

an  $ED_{50}$  value of 77.58 mg/kg. Aguilar-Santamaría and Tortoriello (1996) reported the sedative effect for this plant using the prolongation of sleep time induced by pentobarbital as sedative model; however, no  $ED_{50}$  value was provided in that study to compare with the value obtained in the present work. The validity of the exploratory cylinder model for testing sedative drugs is well established (Rolland et al., 1991; Hiller and Zetler, 1996; Oliva et al., 2004; Ugalde et al., 2005). In this model the rearing numbers decrease with an increase of the doses of sedative drugs, and allows the construction of dose–response curves and the calculus of effective doses for individual drugs and in combination (Ugalde et al., 2005).

It is logical to think that a CNS depressant drug may potentiate the effect of other depressant drugs. However, we found an attenuation of the sedative effect for the case of the combination of ethanol with *Ternstroemia pringlei* extract (Table 2; Fig. 2F). This sub-additive effect is difficult to explain; however, the existence of triterpene saponins has been reported in other species of *Ternstroemia* genus (Shin et al., 2003). It is known that these kinds of compounds have activity in the central nervous system (Ren et al., 2006), and also that they are able to modify the activity of some isoforms of cytochrome P450 enzymes (Henderson et al., 1999), thereafter the ethanol metabolism alteration should not be discarded as a possible explanation in the attenuation of the sedative effect of ethanol observed by the co-administration of *Ternstroemia pringlei* extract. This observation requires experimental support to give a convincing explanation of these facts.

The super-additive effect shown by the simultaneous administration of *Ternstroemia pringlei* extract with pentobarbital (Fig. 2F) is in agreement with the report of Aguilar-Santamaría and Tortoriello (1996) that showed a prolongation of the pentobarbital-induced sleeping time in rodents.

The present study is the first work that investigates the effect on the sedative activity of the simultaneous administration of *Ternstroemia pringlei* extract with buspirone, diazepam, diphenhydramine, ethanol and haloperidol, therefore there are no previous works to contrast our results. Also the absence of phytochemical studies of this plant does not allow establishing a correlation between the components and the activities reported for them. In relation with this, the major component isolated from methanol extract, the *epi*-ursolic acid, showed no sedative effect, but the major activity showed by the aqueous extract suggests that the active compound or compounds should have more polarity than *epi*-ursolic acid. The analysis of the aqueous extract of this plant by thin layer chromatography demonstrated that *epi*-ursolic acid is not present in this extract. So the identification of the active principle remains to be defined in this plant.

Considering all the above-mentioned facts, it is clear that this plant has hard non-predictive interactions with CNS depressant drugs; thereafter the combination of this plant with CNS depressant drugs should be avoided. The use of *Ternstroemia pringlei* should be regulated by health authorities, since several herbal preparations contain extracts made from the crude drug. Those commercial products are promptly accessible in the cities of México where the use of CNS depressant drugs by medical prescription is possible. The plant–drug interactions are less important in rural and indigenous regions where the concomitant use of medicinal plants and drugs are less frequent.

A final point to highlight is that the common name as “Flor de Tila” for this plant is frequently confounded with European Tilas that in Spanish have the same name, and the latter correspond to another genera and another botanical family (*Tilia* sp.; Family *Tilaceae*). In addition, in the labels of some commercial products it is declared that they contain *Tilia* sp. when in reality they contain *Ternstroemia* sp. Therefore it is important that National Health Authorities notify to local consumers as well as to national

and international traders about the potential risk of using this plant concomitantly with CNS depressant drugs.

## 5. Conclusions

The intraperitoneal administration of organic and aqueous crude extracts of fruits of *Ternstroemia pringlei* showed sedative effect in the exploratory cylinder model in mice. Through an isobolographic analysis it was observed that the co-administration of the aqueous extract of *Ternstroemia pringlei* fruits potentiate the sedative effect of buspirone, diazepam, diphenhydramine, haloperidol or pentobarbital and produce an attenuation of the sedative effect of ethanol. According to the results obtained, *Ternstroemia pringlei* is a plant that interacts in a complex form with CNS depressant drugs and it may represent an advertence on the use of this plant concomitantly with other neuroactive drugs.

## Acknowledgments

This work was supported by a grant from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA IN 205008) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT C01-018). J.L. Balderas acknowledges fellowship from CONACYT (116413).

## References

- Aguilar-Santamaría, L., Tortoriello, J., 1996. Anticonvulsant and sedative effects of crude extracts of *Ternstroemia pringlei* and *Ruta chalapensis*. *Phytotherapy Research* 10, 531–533.
- Alcántara, O., Luna, I., Velázquez, A., 2002. Altitudinal pattern of Mexican cloud forest based upon preferential characteristic genera. *Plant Ecology* 161, 167–174.
- Bartholomew, B., McVaugh, R., 1997. Identification and typification of *Ternstroemia lineata* de Candolle (Theaceae). *Novon* 7, 14–16.
- Boom, B.M., 1989. New species of *Ternstroemia* (Theaceae) from Guayana Highland. *Brittonia* 41, 136–142.
- Fugh-Berman, A., Cott, J.M., 1999. Dietary supplements and natural products as psychotherapeutic agents. *Psychosomatic Medicine* 61, 712–728.
- Fugh-Berman, A., Ernst, E., 2001. Herb–drug interactions: review and assessment of reliability. *British Journal of Clinical Pharmacology* 52, 587–595.
- González-Trujano, M.E., Martínez, A.L., Reyes, A., Reyes, B., Navarrete, A., 2006. Palm-tone isolated from *Annona diversifolia* induces an anxiolytic-like effect in mice. *Planta Medica* 72, 703–707.
- Henderson, G.L., Harkey, M.R., Gershwin, M.E., Hackman, R.M., Stern, J.S., Stresler, D.M., 1999. Effects of ginseng components on c-DNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity. *Life Sciences* 65, 209–214.
- Hiller, K., Zetler, G., 1996. Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis* L.: behavioral and anticonvulsant properties. *Phytotherapy Research* 10, 145–151.
- Huang, S.M., Lesko, L.J., 2004. Drug–drug, drug–dietary supplement, and drug–citrus fruit and other food interactions: what have we learned? *The Journal of Clinical Pharmacology* 44, 559–569.
- Ikuta, A., Tomiyasu, H., Morita, Y., Yoshimura, K., 2003. Ursane- and oleanane-type triterpenes from *Ternstroemia gymnanthera* callus tissues. *Journal of Natural Products* 66, 1051–1054.
- Jo, Y., Suh, J., Shin, M.H., Jung, J.H., Im, K.S., 2005. Jacaranone and related compounds from the fresh fruits of *Ternstroemia japonica* and their antioxidative activity. *Archives of Pharmacological Research* 28, 885–888.
- Kikuchi, K., Yamaguchi, M., 1974. The structure of *Ternstroemia xantina*, a new aldehydic C<sub>40</sub>-carotenoid. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 47, 885–887.
- Kobuski, C.E., 1942. Studies in the Theaceae—XIII. Notes on the Mexican and Central American species of *Ternstroemia*. *Journal of the Arnold Arboretum* 23, 464–478.
- Molina, M., Contreras, C.M., Téllez-Alcántara, P., Rodríguez, F., 1999. Sedative action of *Ternstroemia sylvatica* in the male rat. *Phytomedicine* 6, 115–118.
- Mukherjee, K.S., Bhattacharya, M.K., Ghosh, P.K., 1982. A triterpene acid constituent of *Salvia lanata*. *Phytochemistry* 21, 2416–2417.
- Oliva, I., González-Trujano, M.E., Arrieta, J., Enciso-Rodríguez, R., Navarrete, A., 2004. Neuropharmacological profile of hydroalcoholic extract of *Valeriana edulis* ssp. *procera* roots in mice. *Phytotherapy Research* 18, 290–296.
- Ren, L.X., Luo, Y.F., Li, X., Zuo, D.Y., Wu, Y.L., 2006. Antidepressant-like effects of sarsasapogenin from *Anemarrhena asphodeloides* BUNGE (Liliaceae). *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 29, 2304–2306.
- Rolland, A., Fleurentin, J., Lanhers, M.C., Younos, C., Misslin, R., Mortier, F., Pel, J.M., 1991. Behavioral effects of the American traditional plant *Eschscholzia californica*: sedative and anxiolytic properties. *Planta Medica* 57, 212–216.
- Rotblatt, M., Ziment, I., 2002. Evidence-Based Herbal Medicine. Hanley & Belfus, Inc., Philadelphia.
- Shin, M.H., Wang, W., Nam, K.I., Jo, Y., Jung, J.H., Im, K.S., 2003. Triterpenoid saponins from the fruits of *Ternstroemia japonica*. *Journal of Natural Products* 66, 1351–1355.
- Tallarida, R., 1992. Statistical analysis of drug combinations for synergism. *Pain* 49, 93–97.
- Tallarida, R., 2000. Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton.
- Tallarida, R., Porreca, F., Cowan, A., 1989. A statistical analysis of drug–drug and site–site interaction with isobolograms. *Life Sciences* 45, 947–961.
- Tallarida, R., Kimmel, H.L., Holtzman, S.G., 1997. Theory and statistics of detect synergism between two active drugs: cocaine and buprenorphine. *Psychopharmacology* 133, 378–382.
- Tori, M., Fukuyama, H., Nakashima, K., Sono, M., 2005. Degraded terpenoids and aromatic compounds from *Ternstroemia gymnanthera*. *Letters in Organic Chemistry* 2, 262–264.
- Tortoriello, J., Romero, O., 1992. Plants used by Mexican with presumable sedative properties: an ethnobotanical approach. *Archives of Medical Research* 23, 111–116.
- Ugalde, M., Reza, V., González-Trujano, M.E., Avula, B., Khan, I.A., Navarrete, A., 2005. Isobolographic analysis of the sedative interaction between six central nervous system depressant drugs and *Valeriana edulis* hydroalcoholic extract in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57, 631–639.

# SEDATIVE ACTIVITY OF SOME PLANTS USED IN MEXICO TO TREAT INSOMNIA

SILVIA LAURA GUZMÁN-GUTIÉRREZ<sup>a</sup>, JOSÉ LUIS BALDERAS<sup>a</sup>, ABIGAIL AGUILAR<sup>b</sup> AND ANDRÉS NAVARRETE<sup>a,\*</sup>

(Received July 2009; Accepted November 2009)

## ABSTRACT

Insomnia is one of the most common sleep disorders around the world. Species of plants such as *Citrus sinensis*, *Citrus limon*, *Ternstroemia pringlei*, *Ternstroemia sylvatica*, *Casimiroa edulis*, *Galphimia glauca* and *Cymbopogon citratus* are traditionally and widely used in Mexico as sleep aids. The aim of this work was to evaluate the sedative effect of different extracts of these plants by using the exploratory cylinder model in mice. Different doses of the hexane, dichloromethane, methanol or hydroalcoholic extracts were intraperitoneally administered 30 min before testing in order to obtain their sedative ED<sub>50</sub> values. The most active extracts were *Galphimia glauca* methanol extract (ED<sub>50</sub> = 22.06 ± 5.6 mg/kg) and *Cymbopogon citratus* hexane extract (ED<sub>50</sub> = 27.01 ± 2.9 mg/kg), followed by methanol extract obtained from the *Citrus sinensis* leaves (ED<sub>50</sub> = 38.48 ± 8.0 mg/kg) and flowers (ED<sub>50</sub> = 47.04 ± 12.0 mg/kg); whereas, *Ternstroemia sylvatica* methanol extract (ED<sub>50</sub> = 61.88 ± 6.42 mg/kg), *Galphimia glauca* hexane extract (ED<sub>50</sub> = 76.85 ± 20.9 mg/kg) and *Cymbopogon citratus* dichloromethane extract (ED<sub>50</sub> = 77.11 ± 15.0 mg/kg) show lower sedative activity. Other extracts showed an ED<sub>50</sub> value over 100 mg/kg or were inactive. Our results give evidence of the popular use of these medicinal plants as sleep aids.

Key words: Sedative effect; Mexican traditional medicine; Sleep aids; Sedative plants.

## RESUMEN

El insomnio es el desorden del sueño más común en el mundo. Las especies *Citrus sinensis*, *Citrus limon*, *Ternstroemia pringlei*, *Ternstroemia sylvatica*, *Casimiroa edulis*, *Galphimia glauca* y *Cymbopogon citratus* son utilizadas ampliamente y tradicionalmente en México como inductoras de sueño. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto sedante de diferentes extractos de las plantas antes mencionadas utilizando el modelo de cilindro de exploración en ratones. Para obtener los valores de DE<sub>50</sub> sedante se administraron por vía intraperitoneal varias dosis de los

<sup>a</sup>Facultad de Química, Departamento de Farmacia. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 04510, México.

<sup>b</sup>Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. Av. Cuauhtémoc 330, Delegación Benito Juárez 06720, México D.F., México.

\*Corresponding author: Dr. Andrés Navarrete. Facultad de Química, Departamento de Farmacia. Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510. México D.F. México. Telephone: +(55) 56 22 52 91 Fax: +(55) 56 22 53 29 e-mail: [anavarrt@servidor.unam.mx](mailto:anavarrt@servidor.unam.mx)

extractos de hexano, de diclorometano, de metanol o hidroalcohólico, 30 minutos antes de ser evaluados. El extracto más activo fue el metanólico de *Galphimia glauca* ( $DE_{50} = 22.06 \pm 5.6$  mg/kg), seguido del extracto hexánico de *Cymbopogon citratus* ( $DE_{50} = 27.01 \pm 2.9$  mg/kg), los extractos metanólicos de hojas ( $DE_{50} = 38.48 \pm 8.0$  mg/kg) y de flores ( $DE_{50} = 47.04 \pm 12.0$  mg/kg) de *Citrus sinensis*, el metanólico de *Ternstroemia sylvatica* ( $DE_{50} = 61.88 \pm 6.42$  mg/kg) y el extracto de diclorometano de *Cymbopogon citratus* ( $DE_{50} = 77.11 \pm 15.0$  mg/kg). Los otros extractos presentaron un valor de la  $DE_{50}$  mayor a 100 mg/Kg. Nuestros resultados dan soporte al uso popular de las especies estudiadas como inductoras de sueño.

Palabras clave: Efecto sedante, Medicina tradicional mexicana, inductor del sueño, plantas sedantes

## INTRODUCTION

Insomnia is a frequent problem that affects people of all the ages around the world. It is a prevalent and potentially serious condition that adversely affects the diurnal functioning, health status and life quality of people of all of age (Edinger and Means, 2005). Stress, anxiety and depression could trigger insomnia. As well as cough, chronic pain, apnea, circadian rhythm disorders and neural diseases are conditions also associated with insomnia (Harvey, 2001). Insomnia is treated pharmacologically and non-pharmacologically or with a combination of both (Benca, 2005). Benzodiazepines, zolpidem, zopiclone, zaleplon, have been used for the treatment of insomnia (Gottesmann, 2002). The over the counter (OTC) medicines containing the  $H_1$  antagonist diphenhydramine, are also used for treatment of occasional insomnia (Shigemoto *et al.*, 2004). Relaxation, stimulus control, sleep restriction and sleep hygiene are common behavioral therapies for insomnia (Nau *et al.*, 2005).

Medicinal plants constitute another option to treat insomnia. Around the world have been used several plants like sleep inducers, such as Valerian, Passion flower, Melissa, Hops and Kava-Kava (banned) (Wheatley, 2005). Some of the plants more commonly used in Mexico as tranquilizers and sleep aids are “valeriana” (*Valeriana*

*edulis* ssp *procera*), flowers and leaves of *Citrus* sp, “flor de tila” (*Ternstroemia pringlei* and *Ternstroemia sylvatica*), “zapote blanco” (*Casimiroa edulis*), “tê limón” (*Cymbopogon citratus*), “toronjil” (*Agastache mexicana*), “calderona amarilla” (*Galphimia glauca*), “ruda” (*Ruta chalepensis*) and “limón” (*Citrus limon*) (Balderas *et al.*, 2008; Instituto Nacional Indigenista, 1994; Tortoriello and Romero, 1992; Ugalde *et al.*, 2005).

The present work describes the screening study of the sedative activity of different extracts of *Casimiroa edulis*, *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Cymbopogon citratus*, *Galphimia glauca*, *Ternstroemia pringlei* and *Ternstroemia sylvatica*, using the exploratory cylinder test in mice, with the aim to provide experimental support to its traditional use.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

The fruits of *Ternstroemia pringlei* were collected in Zirahuato, Michoacán, Mexico and fruits of *Ternstroemia sylvatica* were collected in Montellano, Puebla, Mexico; *Citrus sinensis* flowers and leaves were obtained from orange producers from El refugio, Ciudad Fernández, San Luis Potosí, Mexico. The leaves of *Cymbopogon citratus* and seeds of *Casimiroa edulis* were acquired from a local market (Mercado So-

nora, Mexico City). The homogeneity and authenticity of the plant materials were certified by one of the authors (A. Aguilar), botanist from the Herbarium of the Instituto Mexicano del Seguro Social. Samples of these materials were deposited in the Herbarium of Instituto Mexicano del Seguro Social. *Galphimia glauca* was collected in Tehuetlán, Hidalgo, Mexico. A sample of this material was deposited at Herbarium of the Universidad Autónoma Chapingo. Voucher numbers for each plant sample are indicated in Table 1. The dry peel of *Citrus limon* was donated by Deshidratadora Tecomense S.A de C.V., Colima, Mexico. A commercial sample of powdered roots of *Valeriana edulis* ssp *procera* was donated by Laboratorios Mixim, Mexico. The dry extract from roots of *Valeriana officinalis* were acquired from Amax NutraSource Inc., USA. Both valerian species were used as sedative plants references.

#### Preparation of the extracts

The air-dried and powdered plant materials (100 to 300 g) were successively extracted with hexane (3x2 L), dichloromethane (3x2 L) and methanol (3x2 L) by maceration at room temperature ( $22 \pm 2$  °C) for one day period. The extracts were filtered by gravity and the solvents were evaporated in vacuum. For seeds of *Casimiroa edulis*, a hydroalcoholic extract was prepared with 400 g of dried seeds and 2 L of a mixture of ethanol-water (7:3) for a 3 days period. The commercial powdered roots of *Valeriana edulis* ssp *procera* (100 g) and *Valeriana officinalis* (100 g) were extracted with 500 mL of a mixture of ethanol-water (7:3) for a 3 days period. The hydroalcoholic extracts were filtered by gravity and concentrated through stem air current at room temperature ( $22 \pm 2$  °C).

#### Chemicals and Drugs

Diphenhydramine and Tween 80 were purchased from Sigma Co. (Sigma St. Louis, MO). Absolute ethanol was of analytical

grade and was purchased from Mallinckrodt Baker (Mexico). The other reagents were of analytical grade.

#### Animals

All experiments were performed on adult male ICR mice (25-34 g; Centro UNAM-Harlan, Harlan Mexico, S.A. de C.V.). Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) adopted in our laboratory, and in compliance with international rules for care and use of laboratory animals. The experimental groups consisted of six animals. They were maintained at constant room temperature ( $22 \pm 1$  °C) and submitted to 12 h light/dark cycle with free access to food and water.

#### Procedure

Diphenhydramine and hydroalcoholic extracts were dissolved in saline solution (0.9 %). All other extracts were suspended in 0.5 % Tween 80 in saline solution (0.9 %). The solutions and the suspensions were freshly prepared each time and intraperitoneally injected in a volume of 0.1 mL/10 g body weight. Control animals received the same volume of vehicle (0.5 % Tween 80 in saline or saline solution only). The diphenhydramine (used as sedative reference drug) and extracts were administered 30 minutes before testing at different doses.

The apparatus consisted of a glass cylinder (30 cm in height, 11 cm in diameter, with wall of 3 mm) set in a vertical position. The cylinder was placed over a flat surface covered with a filter paper in a room with constant lighting and isolated from external noise. An individual naïve mouse was put on the paper covered floor of the glass cylinder; the number of rearings performed over a 5 minutes period was recorded. The inner side of the apparatus was cleaned with alcoholic solution and the paper was changed between each animal test session (Ugalde *et al.*, 2005; Hiller and Zetler, 1996). During

**Table 1.** Medicinal plants used in the Mexican Traditional Medicine as sleep aids.

Number	Scientific name	Family	Popular name	Part used	Voucher
1	<i>Casimiroa edulis</i> Llave & Lex	Rutaceae	Zapote blanco	Seeds	IMSSM15457
2	<i>Citrus limon</i> (Christm.) Swingle	Rutaceae	Limón	Peel and pericarp	Commercial sample, México.
3	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Rutaceae	Naranja	Flowers and leaves	IMSSM15436 (Flowers) IMSSM15437 (Leaves)
4	<i>Cymbopogon citratus</i> (D.C.) Stapf	Poaceae	Zacate limón	Leaves	IMSSM15435
5	<i>Galphimia glauca</i> Cav.	Malpigiaceae	Cola de zorro	Aerial part	XOLO670
6	<i>Ternstroemia pringlei</i> (Rose) Standl	Theaceae	Flor de tila	Fruits	IMSSM15459
7	<i>Ternstroemia sylvatica</i> Schltldl. & Cham.	Theaceae	Flor de tila	Fruits	IMSSM15460
8	<i>Valeriana edulis</i> ssp <i>procera</i> (Kunth) Meyer	Valerianaceae	Valeriana	Roots	Commercial sample, México.
9	<i>Valeriana officinalis</i> L.	Valerianaceae	Valeriana	Roots	Commercial sample, USA

**Table 2.** Sedative ED<sub>50</sub> values of some organic plant extracts using the exploratory cylinder test in mice.

Species	Part of the plant	Extract	ED <sub>50</sub> ± SEM (mg/kg)
<i>Cymbopogon citratus</i>	Leaves	Hexane	27.71 ± 2.9
		Dichloromethane	77.11 ± 15.0
		Methanol	NA
<i>Citrus limon</i>	Peel	Hexane	NA
		Dichloromethane	NA
<i>Citrus sinensis</i>	Flowers	Methanol	355.70 ± 71.5
		Hexane	NA
		Dichloromethane	NA
<i>Citrus sinensis</i>	Leaves	Methanol	47.04 ± 12.0
		Hexane	400.21 ± 59.4
		Dichloromethane	NA
<i>Galphimia glauca</i>	Aerial part	Methanol	38.48 ± 8.0
		Hexane	76.85 ± 20.9
		Dichloromethane	NA
<i>Ternstroemia pringlei</i>	Fruits	Methanol	22.06 ± 5.6
		Hexane	558.00 ± 46.59
		Dichloromethane	631.00 ± 181.4
<i>Ternstroemia sylvatica</i>	Fruits	Methanol	319.00 ± 49.62
		Hexane	752.10 ± 208.44
		Dichloromethane	743.10 ± 208.34
<i>Casimiroa edulis</i>	Seeds	Methanol	61.88 ± 6.42
		Ethanol-water	802.80 ± 165.77
		Ethanol-water	182.62 ± 11.62
<i>Valeriana edulis</i> ssp <i>procera</i>	Roots	Ethanol-water	452.01 ± 47.45
		Ethanol-water	17.06 ± 2.04
<i>Diphenhydramine</i>			

NA: not active until 1600 mg/kg



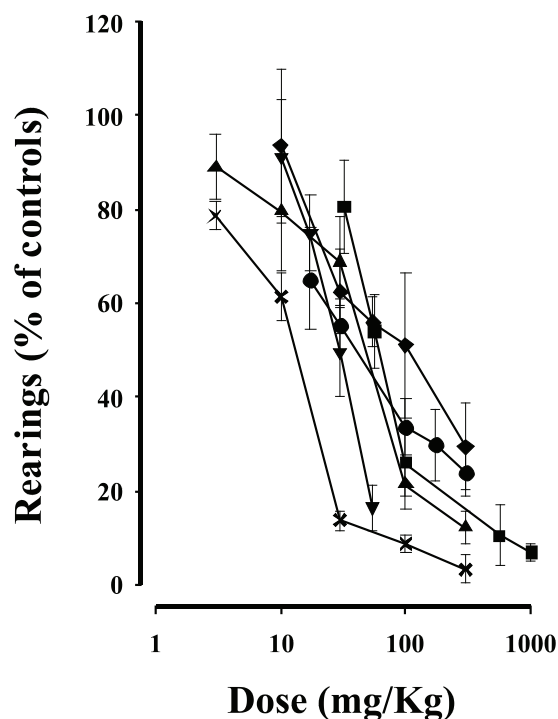
observation, the experimenter stood next to the apparatus, always in the same place. The observations were made without prior knowledge of the experimental conditions applied to the animal. Reduced exploratory rearing showed by naïve mice after placement in an unfamiliar environment reveals a sedative effect (Ugalde *et al.*, 2005; Hiller and Zetler, 1996; Oliva *et al.*, 2004).

Dose-Response curves were constructed for each extract using five different levels of doses. The dose that produced 50 % of sedation ( $ED_{50}$ , 50 % of reduction in the rears number with respect to control group) and its SEM was calculated using standard linear regression analysis of the log dose-response (Tallarida, 2000).

## RESULTS AND DISCUSSION

Intraperitoneal administration of the organic and hydroalcoholic extracts of the species tested resulted in a dose-dependent decrease of the number of rearings in the exploratory cylinder model (Fig. 1). The purpose of evaluating extracts with different polarity was to locate the extract with the major activity of each plant to continue its study to identify the active compounds by a bio-guided fractionation. The most active extract was methanol extract of *Galphimia glauca* ( $ED_{50} = 22.06 \pm 5.6$  mg/kg), followed by hexane extract of *Cymbopogon citratus* ( $ED_{50} = 27.01 \pm 2.9$  mg/kg), methanol extract of leaves of *Citrus sinensis* ( $ED_{50} = 38.48 \pm 8.0$  mg/kg), methanol extract of flowers of *Citrus sinensis* ( $ED_{50} = 47.04 \pm 12.0$  mg/kg), methanol extract of *Ternstroemia sylvatica* ( $ED_{50} = 61.88 \pm 6.42$  mg/kg), dichloromethane extract of *Cymbopogon citratus* ( $ED_{50} = 77.11 \pm 15.0$  mg/kg). Other extracts showed  $ED_{50}$  values over 100 mg/kg (Table 2), whereas the hexane and dichloromethane extracts of *Citrus limon* peel, the hexane and dichloromethane extract of flowers and dichloromethane extract of leaves of *Citrus sinensis*,

methanol extract of *Cymbopogon citratus* and dichloromethane extract of *Galphimia glauca* were inactive. On other hand, hydroalcoholic extract of Mexican valerian (*Valeriana edulis ssp procera*) showed a more potent sedative effect ( $ED_{50} = 182.62 \pm 11.62$  mg/kg) than *Valeriana officinalis* hydroalcoholic extract ( $ED_{50} = 452.01 \pm 47.45$  mg/kg) in the exploratory cylinder model. Diphenhydramine showed an  $ED_{50}$  value of  $17.06 \pm 2.04$  mg/kg. This drug was used as sedative reference drug considering that both diphenhydramine and medicinal plants are used as sleep aids in a similar way. In addition the  $ED_{50}$  sedative values in the exploratory cylinder model for this drug is within of the range of those  $ED_{50}$  sedative values showed by the vegetal extracts.



**Figure 1.** Dose-response curves plotting % of rearing with respect to its control represented on the y-axis for the sedative effect of methanol extracts of flowers of *C. sinensis* (●), fruits of *T. sylvatica* (■), leaves of *C. sinensis* (▲), aerial parts of *G. glauca* (×) and hexane (▼) and dichloromethane extracts (◆) of *C. citratus*. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 6 experiments. Doses (mg/kg) are represented in a logarithmic scale on the x-axis.

The validity of the exploratory cylinder model for testing sedative drugs has been well established (Rolland *et al.*, 1991; Hiller and Zetler, 1996; Ugalde *et al.*, 2005; Oliva *et al.*, 2004; Balderas *et al.*, 2008). In this model the rearings number decrease with an increase of the doses of sedative drugs, and allows the construction of doses-res-ponse curves and the calculus of effective doses for individual drugs (Ugalde *et al.*, 2005).

In a previous work, Tortoriello and Lozoya (1992) describe the sedative effect for *Galphimia glauca* methanol extract based on the prolongation of sleep time induced by pentobarbital. This effect has been attributed to Nor-*seco*-triterpenoid Galphimine B, isolated from methanol extract (Tortoriello and Ortega, 1993). In the present work, both methanol and hexane extracts showed sedative effect in the exploratory cylinder model, suggesting that *Galphimia glauca* contains others non-polar sedative compounds in the hexane extract in addition to Galphimine B, that result interesting to identify.

The activity of *Cymbopogon citratus* on central nervous system (CNS) has already been investigated; the antinociceptive effect has been reported for essential oil and for the infusion prepared from fresh leaves of *Cymbopogon citratus* (Viana *et al.*, 2000; Lorenzetti *et al.*, 1991); Carlini and coworkers did not observe effect on the motor activity and rota-rod tests in rodents for the infusion of *Cymbopogon citratus* (Carlini *et al.*, 1986) and a double blind study with 50 health voluntaries indicated that the infusion did not have anxiolytic-like activity (Leite *et al.*, 1986). In contrast, in the present work a clear sedative effect was observed for hexane extract of this species, suggesting that the active compounds are of nonpolar type including the essential oil. The latter is supported for the low activity of the dichloromethane extract and the absence of sedative activity for the methanol extract. *Cymbopogon citratus* has high content of citral, a natural mixture of two isomeric

aldehydes, neral and geranial (Leite *et al.*, 1986), therefore it is not possible to discard the participation of these components in the sedative activity of hexane extract, because the intraperitoneal administration of citral (100 mg/kg) was able to decrease the rearings in the open field test in a previous work (Carlini *et al.*, 1986) and recently has been reported also that intraperitoneal administration of the essential oil obtained from this medicinal plant in mice induces sedative effect (Blanco *et al.*, 2009).

It has been reported the enhancement of sleeping time induced by sodium pentobarbital, the anxiolytic activity in elevated plus maze model and anticonvulsant activity for essential oil from peel and hydroalcoholic extract of leaves from *Citrus aurantium* in rodents (Carvalho-Freitas and Costa, 2002; Pultrini *et al.*, 2006). In addition, in the present work the methanol extracts from leaves and flowers of *Citrus sinensis* showed sedative activity, suggesting that the active compounds should be polar compounds. Recently we identified the hesperidin as one of the active sedative compounds in flowers of *Citrus sinensis* (Guzmán-Gutiérrez and Navarrete, 2009); however, there are not additional phytochemical or pharmacological studies for flowers and leaves of this species. Studies in progress are running in our laboratory to investigate other active components of the flowers and leaves of methanol extract of *Citrus sinensis*.

The sedative, anxiolytic and anticonvulsant effects for leaves (Mora *et al.*, 2005; Molina-Hernández *et al.*, 2004) and the anticonvulsant activity for seeds (Garzón-de la Mora *et al.*, 1999) of *Casimiroa edulis* have already been reported. However the moderate sedative effect for the seeds of *Casimiroa edulis* is reported here for the first time.

The sedative effect observed for *Ternstroemia pringlei* and *Valeriana edulis* ssp *procera* are in agreement with previous works (Balderas *et al.*, 2008; Ugalde *et al.*, 2005). For *Ternstroemia sylvatica* it

has been reported its sedative activity in rat using simple and repeated intraperitoneal administration once a day for a week. However, these treatments failed to show anxiolytic activity in elevated plus maze model (Molina *et al.*, 1999). Commercial dry extract of *Valeriana officinalis* showed low sedative activity in the exploratory cylinder model ( $ED_{50} = 452.01 \pm 47.45$  mg/kg), even lower than the sedative effect showed for the commercial extract of *Valeriana edulis* ssp *procera* ( $ED_{50} = 182.62 \pm 11.62$  mg/kg). These species are reputed to possess a well demonstrated sedative effect. In this respect, some of the extracts tested here showed sedative activities at lower doses than those showed by *Valeriana* species, indicating a promissory sedative effect.

## CONCLUSION

Using the exploratory cylinder test, it was

possible to perform a quantitative comparison of the sedative effects of several medicinal plants commonly used in Mexico as sleep aids. In this way, plant species with promising sedative activity can be effectively screened and selected for further investigations, including the isolation of active compounds. In addition some species showed more potent sedative effect than valerian species, plants with a very well recognized sedative effect.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA IN 205008) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 82613). S.L. Guzmán-Gutiérrez and J.L. Balderas acknowledge fellowship for graduated studies from CONACYT numbers 200933 and 116413 respectively.

---

## REFERENCES

- Balderas, J., Reza, V., Ugalde, M., Guzmán, L., Serrano, M., Aguilar, A., Navarrete, A. (2008) Pharmacodynamic interaction of the sedative effects of *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standl. with six central nervous system depressant drugs in mice. *Journal of Ethnopharmacology* **119**: 47-52.
- Benca, R. (2005) Diagnosis and treatment of chronic insomnia: A review. *Psychiatric services* **56**: 332-343.
- Blanco, M.M., Costa, C.A.R.A., Freire, A.O., Santos, J.G., Costa, M. (2009) Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. *Phytomedicine* **16**: 265-270.
- Carlini, E., Contar, J., Silva-Filho, A., Silveira-Filho, N., Frochtengarten, M., Bueno, O. (1986) Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Staff). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology* **17**: 37-64.
- Carvalho-Freitas M.I., Costa M. (2002) Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L., *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **25**: 1629-1633.
- Edinger, J., Means, M. (2005) Cognitive-behavioral therapy for primary insomnia. *Clinical*

- Psychology Review* **25**: 539-558.
- Garzón-de la Mora, P., García-López, P.M., García-Estrada, J., Navarro-Ruiz, A., Villanueva-Michel, T., Villarreal-de Puga, L.M., Casillas-Ochoa, J. (1999) *Casimiroa edulis* seed extracts show anticonvulsive properties in rats. *Journal of Ethnopharmacology* **68**: 275-282.
- Gottesmann, C. (2002) GABA mechanisms and sleep. *Neuroscience* **111**: 231-239.
- Guzmán-Gutiérrez, S.L., Navarrete A. (2009) Pharmacological exploration of the sedative mechanism of hesperidin identified as the active principle of *Citrus sinensis* flowers. *Planta Medica* **75**: 295-301.
- Harvey, A. (2001) Insomnia: symptom or diagnosis? *Clinical Psychology Review* **21**: 1037-1059.
- Hiller K.O., Zetler G. (1996) Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis* L.: Behavioral and anticonvulsant properties. *Phytotherapy Research* **10**: 145-151.
- Instituto Nacional Indigenista. (1994) Flora medicinal indígena de México II. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana., México pp 594.
- Leite, J., Seabra, M., Maluf, E., Assolant, K., Suchecki, D., Tufik, S., Klepacz, S., Calil, H., Carlini, E. (1986) Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Staff). III. Assessment of eventual toxic, hypnotic and anxiolytic effects on humans. *Journal of Ethnopharmacology* **17**: 75-83.
- Lorenzetti, B., Souza, G., Sarti, S., Santos, D., Ferreira, S. (1991) Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. *Journal of Ethnopharmacology* **34**: 43-48.
- Molina, M., Contreras, C.M., Tellez-Alcantara, P., Rodriguez, F. (1999) Sedative actions of *Ternstroemia sylvatica* in the male rat. *Phytomedicine* **6**: 115-118.
- Molina-Hernández, M., Tellez-Alcantara, N. P., Pérez, J., Olivera, J. I., Jaramillo, M. T. (2004) Anxiolytic-like actions of leaves of *Casimiroa edulis* (Rutaceae) in male Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* **93**: 93-98.
- Mora, S., Diaz-Veliz, G., Lungenstrass, H., García-González, M., Coto-Morales, T., Poletti, C., De Lima, T.C.M., Herrera-Ruiz, M., Tortoriello, J. (2005) Central nervous system of hydroalcoholic extract of *Casimiroa edulis* in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology* **97**: 191-197.
- Nau, S.D., McCrae, C.S., Cook, K.G., Lichstein, K.L. (2005) Treatment of insomnia in older adults. *Clinical Psychology Review* **25**: 645-672.
- Oliva, I., González-Trujano, M.E., Arrieta, J., Enciso-Rodríguez, R., Navarrete, A. (2004) Neuropharmacological profile of hydroalcohol extract of *Valeriana edulis* ssp. *procera* roots in mice. *Phytotherapy Research* **18**: 290-296.
- Pultrini Ade.M., Galindo L.A., Costa M. (2006) Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Science* **78**: 1720-1725.
- Rolland A., Fleurentin J., Lanhers M.C., Younos C., Misslin R., Mortier F., Pel, J.M. (1991) Behavioral effects of the American traditional plant *Eschscholzia californica*: Sedative and anxiolytic properties. *Planta Medica* **57**: 212-216.
- Shigemoto Y., Shinomiya K., Mio M., Azuma N., Kamei C. (2004) Effects of second-generation histamine H1 receptor antagonists on the sleep-wakefulness cycle in rats. *European Journal of Pharmacology* **494**: 161-165.
- Tallarida, R.J., (2000) Drug synergism and dose-effect data analysis. Chapman and Hall/CRC., USA pp. 21-35.
- Tortoriello, J., Romero, O. (1992) Plants used by Mexican Traditional Medicine with presumable sedative properties: An ethobotanical approach. *Archives of Medical Research* **23**: 111-116.
- Tortoriello, J., Lozoya, X. (1992) Effect of *Galphimia glauca* methanolic extract on neurophar-

- macological tests. *Planta Medica* **58**: 234-236.
- Tortoriello, J., Ortega, A. (1993) Sedative effect of Galphimine B, a nor-seco-triterpenoid from *Galphimia glauca*. *Planta Medica* **59**: 398-400.
- Ugalde M., Reza V., González-Trujano M.E., Avula B., Khan I.A., Navarrete A. (2005) Isobolographic analysis of the sedative interaction between six central nervous system depressant drugs and *Valeriana edulis* hydroalcoholic extract in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **57**: 631-639.
- Viana, G., Vale, T., Pinho, R., Matos, F. (2000) Antinociceptive effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* **70**: 323-327.
- Wheatley, D. (2005). Medicinal plants for insomnia: A review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *Journal of psychopharmacology* **19**: 414-421.

## ORIGINAL ARTICLE

## Toxic rather than neuropharmacological effect of *Ternstroemia sylvatica* fruits and identification of 28-O-[ $\beta$ -L-6-rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol as a new compound with toxic effects in mice\*

José Luis Balderas-López<sup>1</sup>, Alejandro Alfaro-Romero<sup>1</sup>, Amor Monroy<sup>1</sup>, Ma. Edith López-Villafranco<sup>2</sup>, José Fausto Rivero-Cruz<sup>1</sup>, and Andrés Navarrete<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México D.F., México and <sup>2</sup>Herbario IZTA, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Estado de México, México

### Abstract

**Context:** Fruits of *Ternstroemia sylvatica* Schltld. and Cham. (Theaceae) are used in Mexican traditional medicine to alleviate anxiety, sleep disorders and seizures; however, the active principles have not been identified.

**Objective:** To identify the neuroactive principles of *T. sylvatica* fruits using neuropharmacological tests on mice.

**Materials and methods:** The methanol and aqueous extracts of pericarp or seeds of *T. sylvatica* fruits were intraperitoneally administered (1–562 mg/kg, single doses) to mice. The exploratory cylinder, hole board, open field, Rota-rod and sodium pentobarbital-induced hypnosis tests were used to evaluate the CNS depressant effect after 30 min single administration of extracts. From aqueous seeds extract, triterpene glycoside 28-O-[ $\beta$ -L-6-rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol was isolated an active compound.

**Results:** Crude extracts of *T. sylvatica* fruits, separated from seed and pericarp, showed sedative effect in mice. The aqueous (ED<sub>50</sub> = 4.9 ± 0.8 mg/kg) seed extracts is the most active among them. This extract also decrease locomotor activity and disrupt motor coordination of mice. This extract was also the most toxic extract (LD<sub>50</sub> = 5.0 ± 1.4 mg/kg; *i.p.*). The triterpene glycoside 28-O-[ $\beta$ -L-6-rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol was identified in this extract as one of the active sedative compounds (ED<sub>50</sub> = 0.12 ± 0.01 mg/kg) also with toxic effect (LD<sub>50</sub> = 1.11 ± 0.23 mg/kg).

**Conclusion:** The results suggest that *T. sylvatica* fruits has toxic activity rather than CNS depressant activity in mice and that this effect might be related to the presence of 28-O-[ $\beta$ -L-6-rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol, one of the active principles of *T. sylvatica* fruits with sedative and toxic effect.

### Introduction

*Ternstroemia* is the largest genus in the Theaceae family with an estimated 130 species worldwide. It has been reported that 12 *Ternstroemia* species occur in México (Boom, 1989). Fruits of several species from *Ternstroemia* are commonly known in México as ‘Flor de Tila’, and they are used in Mexican traditional medicine to alleviate anxiety, sleep disorders and seizures (Aguilar-Santamaría & Tortoriello, 1996; Molina et al., 1999; Tortoriello & Romero, 1992).

*Ternstroemia pringlei* (Rose) Standl. (synonym *Ternstroemia lineata* DC) and *Ternstroemia sylvatica* Schltld. and Cham. are the two major *Ternstroemia* species used as decoctions in Mexican traditional medicine to treat insomnia and fear (Molina et al., 1999). The *T. sylvatica* fruits contain 40% of seeds and 60% of pericarp. Traditionally, the decoctions of these plants are prepared from their whole ground fruits. Pharmacological studies have shown that fruits of *T. pringlei* (Bartholomew & McVaugh, 1997; Kobuski, 1942) produce sedative and anticonvulsive effects in rats (Aguilar-Santamaría & Tortoriello, 1996), and interact in a complex form with CNS depressant drugs (Balderas et al., 2008). Fruits of *T. sylvatica* have sedative effects more than anxiolytic effects in rats (Aguilar-Santamaría & Tortoriello, 1996; Molina et al., 1999; Tortoriello & Romero, 1992). Recently, the isolation of jacaranone as a sedative substance from *T. pringlei* was reported (Lozada-Lechuga et al., 2010). Phytochemical studies of *Ternstroemia* species have reported the isolation of oleanane- and ursane-type

\*Taken in part from the PhD work of J. L. Balderas.

Correspondence: Dr. Andrés Navarrete, Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México D.F., México. Tel: +(55) 5 622 52 91. Fax: +(55) 5 622 53 29. E-mail: anavarrt@unam.mx

triterpenoids, triterpenoid glycosides, triterpenoid saponins, carotenoids, monoterpenoids, tannins and other aromatic compounds (Balderas et al., 2008; Ikuta et al., 2003; Jo et al., 2005; Kikuchi & Yamaguchi, 1974; Shin et al., 2003; Tori et al., 2005). However, there are no additional reports concerning neuropharmacological effects of *T. sylvatica* fruits. Therefore, this study was undertaken to evaluate the neuropharmacological effects of *T. sylvatica* fruits using several experimental models to identify the active principle(s) of this medicinal plant. However, the experimentation led to the identification of a toxic effect greater than the neuropharmacological effect of this plant and to the identification of a new glycoside triterpenoid as one of the toxic compounds from *T. sylvatica*.

## Materials and methods

### Drugs and reagents

Tween 80 was purchased from Sigma Co. (St. Louis, MO), diazepam (Valium™) was purchased from Roche S.A. (México). The extracts were dissolved in saline solution (0.9%) and the drugs were dissolved in 0.5% Tween 80 in saline solution. All solutions were freshly prepared each time and administered intraperitoneal or orally in a volume of 0.1 mL/10 g body weight in single administration. Control animals received the same volume of vehicle (0.5% Tween 80 in saline solution or saline solution only).

### Experimental animals

All experiments were performed on adult male ICR mice (25–34 g; Centro UNAM-Harlan, Harlan México, S. A. de C. V.). The experimental groups consisted of six animals. The animals were maintained at constant room temperature (22 ± 2 °C) and subjected to a 12 h light/dark cycle with free access to food and water.

To optimize the number of laboratory animals used, exploratory cylinder and hole board tests and open field and sodium pentobarbital-induced hypnosis tests were performed consecutively.

Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) adopted in our laboratory, and in compliance with international rules on care and use of laboratory animals. Furthermore, clearance for conducting the studies was obtained from the Ethics Committee for the Use of Animals in Pharmacological and Toxicological Testing (CICUAL/020/11, 2011), Facultad de Química, UNAM. Behavioral experiments were carried out between 10:00 and 14:00 h.

### Plant material

The fruits of *T. sylvatica* Schltldl. and Cham. were collected at Pahuatlán, Puebla, Mexico, in June 2007. The authenticity of the plant materials was certified by M.E. Flores-Villafranco, botanist of the FES Iztacala UNAM Herbarium. Samples were deposited in this herbarium with the voucher number IZTA42169. The fruits of *T. sylvatica* have an average weight of 543 ± 123 mg ( $n = 10$ ); 40% of them correspond to

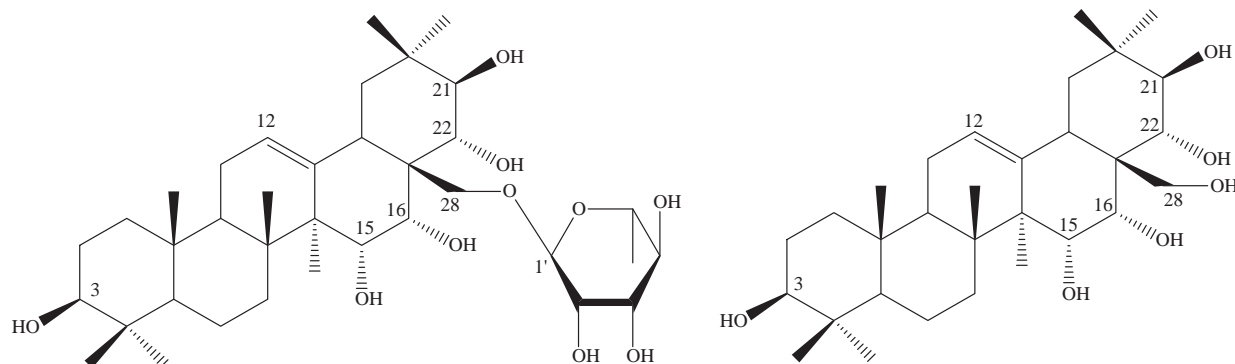
seeds (221 ± 81 mg). Therefore, we decided to test the pericarp and seeds separately.

### Preparation of extracts

The seeds and pericarp from dried fruits of *T. sylvatica* were manually separated. After grinding using a manual miller, 374 g of pericarp and 56.2 g of seeds were extracted separately at room temperature with hexane (3 × 2 L, 24 h each), then with dichloromethane (3 × 2 L, 24 h each) and, finally, with methanol (3 × 2 L, 24 h each); evaporation of the solvents in vacuum gave 1.44 g of hexane (0.39% yield), 2.01 g of dichloromethane (0.54% yield) and 50.17 g of methanol (13.41% yield) extracts as syrupy residues from pericarp, and 17.59 g of hexane (31.30% yield), 5.51 g of dichloromethane (9.81% yield) and 3.80 g of methanol (6.76% yield) extracts from seeds. Aqueous extracts were prepared with 200 g of dried and powdered seeds or 200 g of pericarp by boiling them in 1.8 L of distilled water for 10 min. Afterwards, the extracts were filtered by gravity and concentrated through air current at room temperature (22 ± 2 °C) obtaining 27.9 g (13.9% yield) of a breakable reddish solid for pericarp and 28.4 g (14.2% yield) of a pale beige solid for seeds.

### Isolation of 28-O-[[β-L-6-rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol

The active aqueous seeds extract of *T. sylvatica* (20 g) was partitioned with *n*-BuOH (2 L). Both aqueous and *n*-butanol fractions were concentrated under reduced pressure (40 °C at 72 mbar for water and 40 °C at 25 mbar for *n*-BuOH) to obtaining 9.3 g and 9.0 g of aqueous and *n*-BuOH fractions, respectively. A sample of the *n*-butanol soluble fraction (1.0 g) was chromatographed using a Sephadex LH-20 column (400 mm × 40 mm i.d.) and eluted with MeOH to give 20 fractions of 50 mL each. Fractions 3–5 (200 mg) were pooled and subjected to an additional medium pressure RP-C<sub>18</sub> silica gel column chromatography (450 mm × 25 mm i.d.) eluted with MeOH:H<sub>2</sub>O (9:1, 8:2, 7:3 and 5:5, each 30 mL) to afford 78.60 mg of white powder. A part of this powder (50 mg) was applied to a medium pressure C<sub>18</sub> column (450 mm × 25 mm i.d.) and eluted with MeOH to afford 30 mg of white amorphous powder. A posterior purification by preparative RP-TLC eluted with H<sub>2</sub>O:MeOH:CH<sub>3</sub>CN (2:1:1) yielded a pure white amorphous powder (20 mg) with a melting point (m.p.) 288–290 °C. This compound was identified as 28-O-[[β-L-6-rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol (**1**, Figure 1) by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (Table 1). A portion of this powder (15 mg) was refluxed with 2 N HCl for 3 h. After neutralization with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10% w/v in water), the reaction mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL × 3). The aqueous phase was dried under vacuum and then treated with 40 μL of Sigma-Sil-A reagent at 60 °C by 10 min and analyzed by GC/MS for sugars. The organic phase was washed with H<sub>2</sub>O (2 mL × 2) and evaporated to yield a pale yellow solid (7 mg). From this, reaction mixture was separated by preparative silica gel TLC (eluting with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1) a white solid with a m.p. >300 °C. The MS and proton NMR (400 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>) data corresponded to data previously reported (Fu et al., 2005) for R<sub>1</sub>-barrigenol (**1a**).

Figure 1. Structure of compounds **1** and **1a**.Table 1. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectral data for compounds **1** and **1a**.

Position	<b>1</b>		<b>1a</b>
	$\delta$ ( <sup>13</sup> C) <sup>a</sup>	$\delta$ ( <sup>1</sup> H) <sup>b</sup>	
1	47.92	1.48 dd ( <i>J</i> = 4, 12 Hz)	
2	41.57	2.82 m	
3	78.13	3.06 t ( <i>J</i> = 12 Hz)	3.19 m
4	39.41	–	–
5	55.72	0.97 m	
6	19.22	1.66 m	
7	36.90	2.17 m	
8	42.11	–	–
9	39.36	1.89 m	
10	37.53	–	–
11	24.14	1.98 m	
12	124.58	5.55 t ( <i>J</i> = 4 Hz)	5.58 m
13	144.86	–	–
14	54.58	–	–
15	67.51	4.46 m	3.88 m
16	72.48	4.98 m	4.57 m
17	48.21	–	–
18	47.51	1.84 m	
19	47.58	–	–
20	36.52	–	–
21	78.45	4.85 d ( <i>J</i> = 12 Hz)	3.92 d ( <i>J</i> = 6 Hz)
22	77.20	4.63 d ( <i>J</i> = 12 Hz)	4.27 dd ( <i>J</i> = 9, 6 Hz)
23	16.74	1.88 s	1.20 s
24	17.72	1.08 s	1.60 s
25	16.06	1.01 s	1.01 s
26	28.82	1.25 s	1.14 s
27	21.19	1.14 s	1.55 s
28	72.28	4.51 m	4.10 m
29	30.71	1.37 s	1.48 ws
30	19.54	1.41 s	–
1'	102.79	5.12 d ( <i>J</i> = 4 Hz)	–
2'	72.87	4.44 dd ( <i>J</i> = 4, 8 Hz)	–
3'	73.96	4.26 t ( <i>J</i> = 8 Hz)	–
4'	67.78	4.13 m	–
5'	69.69	3.63 m	–
6'	18.71	1.64 d ( <i>J</i> = 8 Hz)	–

<sup>a</sup>100 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>; <sup>b</sup>400 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>.

## Pharmacological studies

### Sedative activity in the exploratory cylinder test

The apparatus consisted of a glass cylinder (30 cm in height, 11 cm in diameter, with wall of 3 mm). The cylinder was placed on a filter paper in a room with constant lighting and isolated from external noise. An individual naïve mouse was put on the filter paper-covered floor of the glass cylinder; the number of rears performed over a 5 min period

was recorded. The inner side of the apparatus and floor were cleaned with ethanol solution (10% v/v) and the filter paper was changed between each animal test session. The extracts, compounds or drugs were administered 30 min before testing in different doses. During observation, the experimenter stood next to the apparatus always at the same place. The observations were made without prior knowledge of the experimental conditions applied to the animal. Reduced exploratory rearing showed by naïve mice after placement in an unfamiliar environment reveals a sedative effect (Hiller & Zetler, 1996; Oliva et al., 2004; Rolland et al., 1991; Ugalde et al., 2005).

### Open field test

The locomotor behavior was assessed on open field test. The open field was made with an acrylic cage of 20 cm in height. The floor of the open field, 26 cm in length and 18 cm in width, was divided into 12 squares (4 cm × 4 cm) with 2 cm strips. Thirty minutes after the administration of extracts or compounds, each mouse was placed individually at the center of the apparatus and observed for 2 min to record the locomotion as number of segments crossed with the four paws (Walsh & Cummins, 1976).

### Hole board test

Thirty minutes after the administration of extracts or compounds, each mouse was placed into the hole board apparatus (Ugo Basile 6650 Hole Board). The number of holes explored was recorded automatically during 3 min. This test was used to evaluate emotionality, anxiety and/or response to stress in animals. A decrease in the number of head-dips reveals the anxiolytic behavior (Boissier & Simon, 1962).

### Sodium pentobarbital-induced hypnosis.

Sodium pentobarbital at a dose of 42 mg/kg was intraperitoneally administered 33 min after the intraperitoneal administration of extracts. Each mouse was observed for the loss of righting reflex (hypnosis) and duration of sleep. The time between loss and recovery of the righting reflex was recorded as sleeping time (González-Trujano et al., 1998).

### Effect on motor coordination on rota-rod test.

Mice which remained on the rod (Rota-rod Treadmills for mice, constant speed model 7600, Ugo Basile; 4 cm diameter, 16rpm) for at least 3 min were selected and allocated to



Table 2. Sedative effect in the exploratory cylinder test of *Ternstroemia sylvatica* extracts after intraperitoneal administration in mice.

Plant/Drug	Extract	ED <sub>50</sub> ± S.E.M. (mg/kg)
<i>Ternstroemia sylvatica</i> (pericarp)	Methanol	61.9 ± 6.4
	Aqueous	41.5 ± 19.9
<i>Ternstroemia sylvatica</i> (seeds)	Methanol	13.8 ± 1.7
	Aqueous	4.9 ± 0.8
Diazepam	–	3.04 ± 1.14

groups of six animals each. Immediately after administration extracts, diazepam or vehicle by intraperitoneal route, mice were placed on the rod. The time each animal remained on the rod ('time-on-rod') was recorded every 10 min for a total recording of 120 min. Effect on motor coordination was considered when mice remained on the rod for less than 2 min (González-Trujano et al., 1998).

#### Acute toxicity study (LD<sub>50</sub>)

The acute toxicity of extracts was estimated by intraperitoneal administration. Mice were kept under observation for the following 14 d after single administration of extracts (1–316 mg/kg single doses) at constant room temperature (22 ± 2 °C) and submitted to a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. Their weights were registered daily, and at the end of the study a macroscopic tissue evaluation was done. The acute toxicity of 28-*O*-[β-L-6-rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol was estimated by a single intraperitoneal administration (0.1–10.0 mg/kg) and observation for the following 14 d in the same conditions described above.

#### Statistical analysis

Results are expressed as mean ± S.E.M. of six repetitions. Statistical differences between experimental and control groups were performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's test. A value of  $p < 0.05$  was considered to be significant.

#### Results

The methanol and aqueous extracts of *T. sylvatica* seeds showed potent sedative effect in exploratory cylinder test after intraperitoneal administration in mice (Table 2). The aqueous seeds extract showed a sedative effect (ED<sub>50</sub> = 4.9 ± 0.8 mg/kg) like diazepam (ED<sub>50</sub> = 3.04 ± 1.14 mg/kg), which was used as reference a sedative drug (Table 2). However, single or repeated intragastric administration of aqueous extracts did not show sedative effect (Table 3). In addition, the sodium pentobarbital-induced hypnosis time was prolonged by the intraperitoneal administration of methanol or aqueous extracts of *T. sylvatica* seeds (Figure 2). However, higher doses of methanol (32 and 100 mg/kg) or aqueous (56 and 100 mg/kg) extracts of *T. sylvatica* seeds induced death of the animals during sodium pentobarbital-induced hypnosis.

Aqueous extract of *T. sylvatica* seeds significantly decreased the motor coordination of the animals in a dose-dependent manner (ED<sub>50</sub> = 52.21 ± 4.45 mg/kg) without recuperation in the rota-rod test (Figure 3). However at 100 mg/kg this extract induced the death of all animals 70 min after

Table 3. Sedative effect of *Ternstroemia sylvatica* aqueous extracts in the exploratory cylinder test by acute and repeated intragastric administration.

Dose (mg/kg)	Single dose		Repeat dose by 5 d	
	Rearings/ 5 min ± S.E.M.	Mortality	Rearings/ 5 min ± S.E.M.	Mortality
Vehicle				
–	55.2 ± 3.9	0/24	52.7 ± 3.7	0/17
<i>Ternstroemia sylvatica</i> (pericarp)				
100	49.3 ± 3.6	0/6	55.7 ± 3.8	0/6
316	40.2 ± 5.2	0/6	53.3 ± 7.3	0/6
1000	50.5 ± 4.4	0/6	55.3 ± 6.5	
<i>Ternstroemia sylvatica</i> (seeds)				
5.6	32.0 ± 5.7*	0/6	63.0 ± 3.5	0/6
10	38.0 ± 2.9	0/6	60.2 ± 6.8	0/6
100	40.2 ± 6.3	0/6	55.5 ± 7.7	0/6
316	35.8 ± 7.8	0/6	39.7 ± 2.9	3/6
1000	37.3 ± 5.6	0/6	30 ± 0	5/6

Data represent mean ± S.E.M.  $n = 6$ . \* $p < 0.05$  significantly different from vehicle; ANOVA followed by Dunnett's test.

its administration. Methanol extract did not change the motor coordination of the mice.

From the aqueous seeds extract, it was isolated as a white amorphous powder (Compound **1**) with a m.p. 288–290 °C (recrystallized from MeOH). This compound was identified as 28-*O*-[β-L-6-rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (Table 1). This pure compound showed potent sedative activity in the exploratory cylinder test (ED<sub>50</sub> = 0.12 ± 0.01 mg/kg, Figure 4A) and significantly reduced the nose-poking activity in the hole board test (ED<sub>50</sub> = 1.02 ± 0.0 mg/kg, Figure 4B). Whereas the aqueous extract of seeds of *T. sylvatica* was less active (ED<sub>50</sub> = 8.81 ± 2.83 mg/kg) than compound **1**. Diazepam showed an ED<sub>50</sub> = 2.56 ± 1.35 mg/kg in this test.

Compound **1** and aqueous extract of seeds from *T. sylvatica* significantly decreased, in a dose-dependent manner, the locomotor activity (ED<sub>50</sub> = 0.35 ± 0.11 and 26.64 ± 2.37 mg/kg, respectively) in the open field test (Figure 5).

*T. sylvatica* seed aqueous extract was the most toxic extract by the intraperitoneal route (LD<sub>50</sub> = 5.0 ± 1.4 mg/kg). *T. sylvatica* aqueous extract produced a weight loss of 15% of the animals during observation period (14 d). Autopsy of mice showed peritoneal extravasations and bleedings in stomach and gut. The intragastric administration of the aqueous extract up to 1000 mg/kg neither induced death nor weight loss of the animals during the observation period (14 d). But repeated intragastric administration of 316 mg/kg of *T. sylvatica* seeds aqueous extract every 24 h for 5 d induced 50% mortality, while the repeated intragastric administration of 1000 mg/kg of *T. sylvatica* seeds aqueous extract every 24 h for 5 d induced 83% mortality (Table 3).

The 28-*O*-[β-L-6-rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol showed also high toxicity in mice (LD<sub>50</sub> = 1.11 ± 0.23 mg/kg).

#### Identification of 28-*O*-[β-L-6-rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol

In the negative ion FAB-MS of compound **1**, quasi-molecular ion peak was observed at  $m/z$  651 (M – H)<sup>–</sup> and high-resolution negative ion FAB-MS revealed the molecular

Figure 2. Effect of methanol (A) and aqueous (B) extracts of *Ternstroemia sylvatica* on latency and duration of pentobarbital-induced hypnosis in mice. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M.  $n = 6$ . \* $p < 0.05$  significantly different from vehicle; ANOVA followed by Dunnett's test.

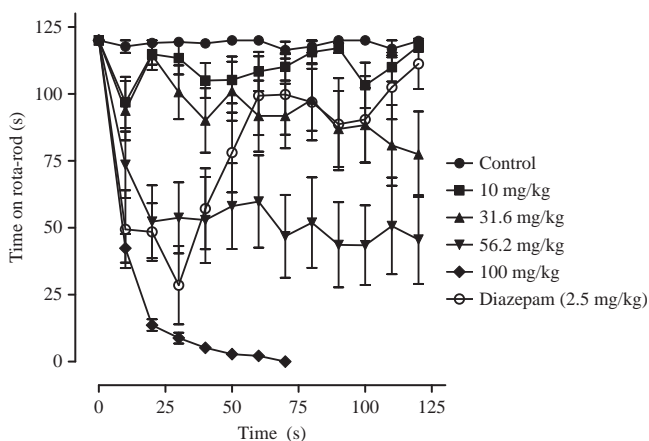
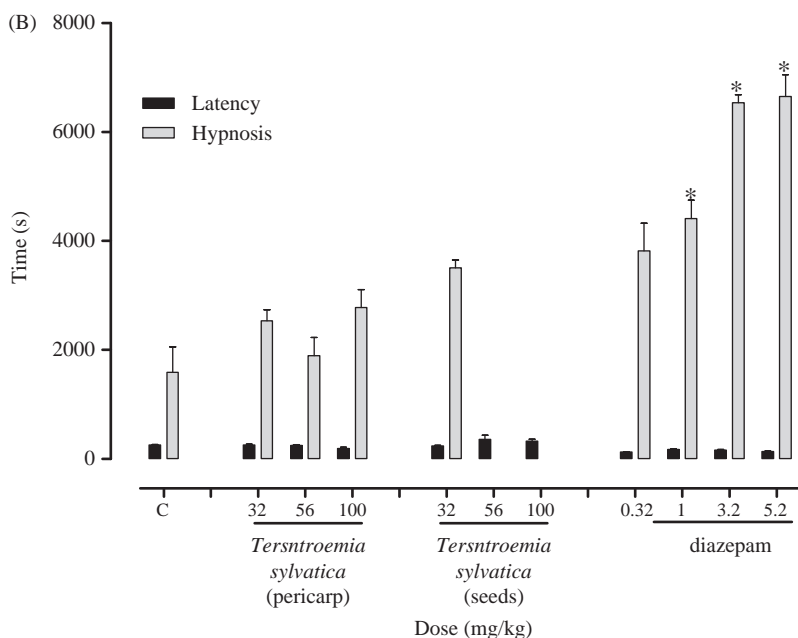
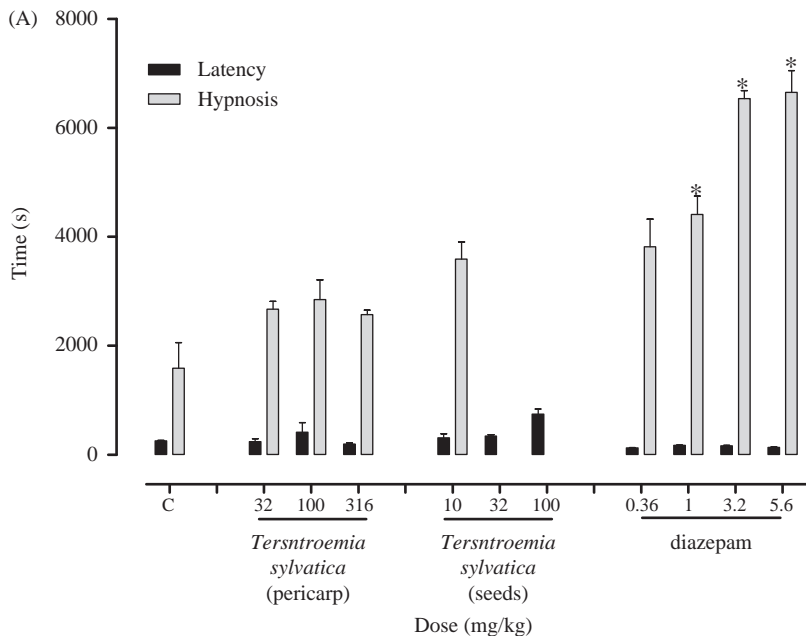


Figure 3. Effect of aqueous extract of *Ternstroemia sylvatica* seeds on motor coordination in the rota-rod test. Symbols represent mean  $\pm$  S.E.M.  $n = 6$ .

formula to be C<sub>36</sub>H<sub>60</sub>O<sub>10</sub>. Another significant fragment ion peak was observed at  $m/z$  505 [(M-H)-146]<sup>-</sup>, which revealed the elimination of one 6-desoxyhexosyl moiety. Full assignment of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C signals of **1** were accomplished through analysis of the <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, TOCSY, HSQC, HMBC (Figure 6) and NOESY (Figure 7) spectra. The <sup>1</sup>H NMR spectrum of **1** showed signals for seven angular methyl groups as singlets [1.88 (H-23), 1.08 (H-24), 1.01 (H-25), 1.25 (H-26), 1.14 (H-27), 1.37 (H-29), 1.41 (H-30)], one olefinic proton at  $\delta$ H 5.55 (1H, t,  $J = 4$  Hz, H-12), five oxygen-bearing methyne protons at 3.06 (1H, t,  $J = 12$  Hz, H-3), 4.46 (1H, m, H-15), 4.98 (1H, m, H-16), 4.85 (1H, d,  $J = 12$  Hz, H-21) and 4.63 (1H, d,  $J = 12$  Hz, H-22), and one primary alcoholic function at 4.51 (2H, m, H-28). In the NOESY experiment, cross-peaks between  $\delta$ H 4.46 (H-15) and  $\delta$ H 4.98 (H-16), and between  $\delta$ H 4.98 (H-16) and  $\delta$ H 4.51 (H-28), allowed the location of two secondary

Figure 4. Effect of 28-*O*-[ $\beta$ -L-rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol in Exploratory Cylinder test (A) and hole board test (B) in mice. Symbols represent mean  $\pm$  S.E.M.  $n = 6$ . \* $p < 0.05$  significantly different from vehicle; ANOVA followed by Dunnett's test.

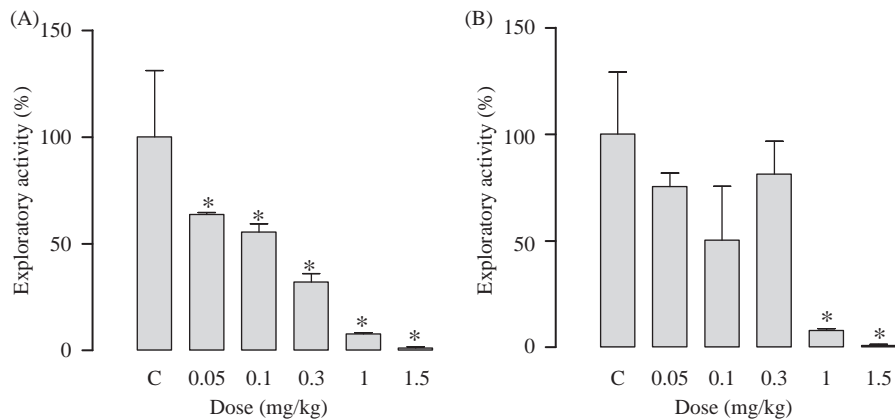


Figure 5. Effect of 28-*O*-[ $\beta$ -L-rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol (A) and aqueous extract of seeds from *Ternstroemia sylvatica* (B) in open field test in mice. Symbols represent mean  $\pm$  S.E.M.  $n = 6$ . \* $p < 0.05$  significantly different from vehicle; ANOVA followed by Dunnett's test.

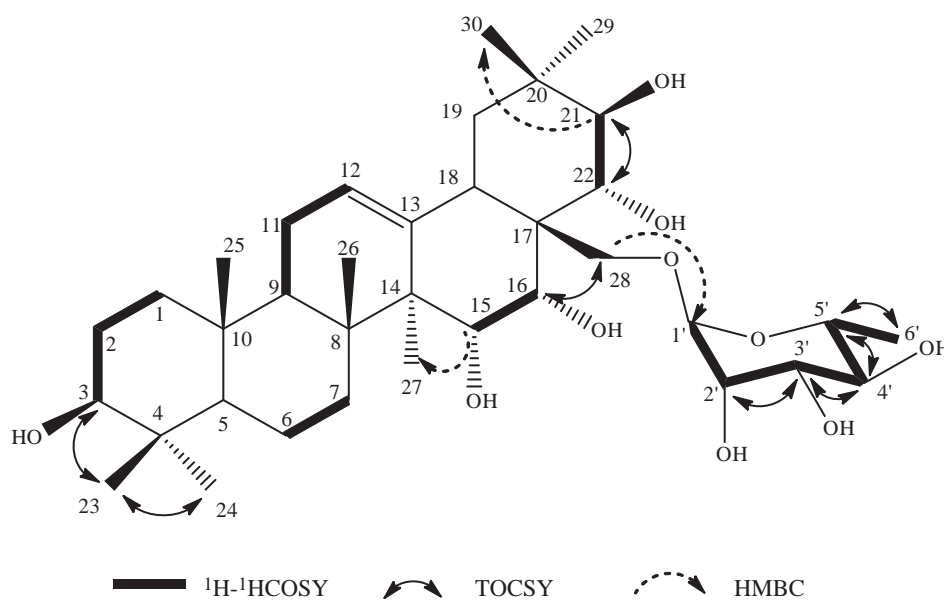
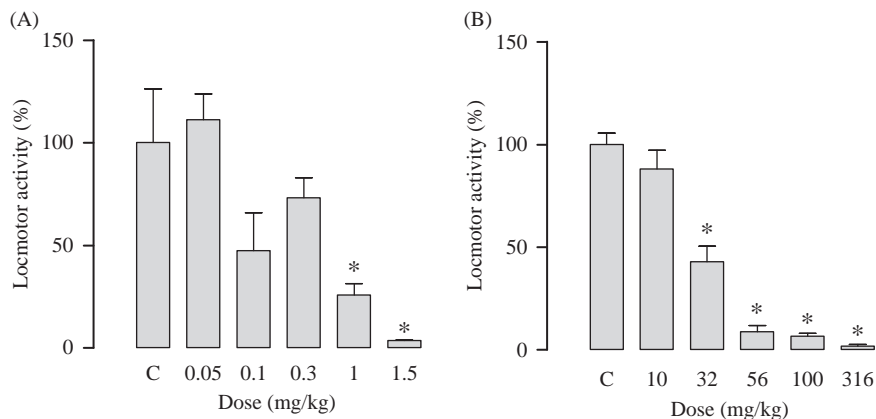
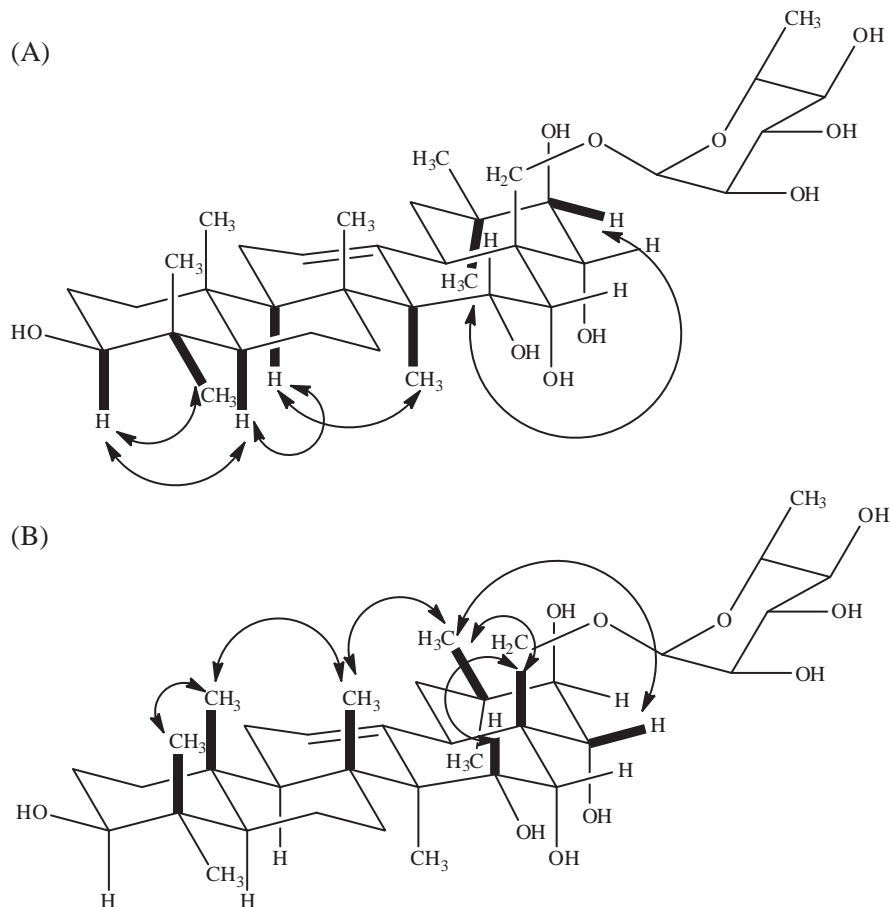


Figure 6. Selected key correlations in  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, TOCSY and HMBC experiments of compound 1.

alcoholic functions at C-15 and C-16. The hydroxyl group at C-15 was confirmed by a correlation between  $\delta\text{C}$  67.51 (C-15) and  $\delta\text{H}$  1.14 (s) (H-27) in the HMBC experiment. In this spectrum, it was also observed the correlation between C-21 at  $\delta\text{C}$  78.45 with the two methyl group signals at  $\delta\text{H}$  1.37 (s, H-29) and 1.41 (s, H-30). A correlation in the HMBC experiment between H-28 at  $\delta\text{H}$  4.51 and the anomeric signal at  $\delta\text{C}$  102.8 suggested that a sugar was attached to C-28. The

sugar was identified as L-rhamnose with the help of  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and TOCSY spectra. The characteristic double signal for C-6' of L-rhamnose appeared at  $\delta\text{H}$  1.64 ( $J = 8\text{ Hz}$ , Table 1).

The relative configurations of C-3, C-15, C-16, C-21 and C-22 of the R<sub>1</sub>-barrigenol unit were determined by the multiplicity and the coupling constants of carbinol protons, supported by the connectivity observed in the NOESY

Figure 7. Selected key correlations in NOESY experiment of compound **1**.

spectrum: H-3, H-5 and H-24; H-15, H-16, H-26 and H-28; H-22 and H-30; and H-21 and H-29. On the basis of the above results, the structure of **1** was elucidated as 28-O-[ $\beta$ -L-6-rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol, a new glycoside triterpene. Acid hydrolysis of **1** with 2 N HCl yielded **1a** as an aglycone, together with L-rhamnose identified by GC/MS analysis of their trimethylsilyl derivative (Kirmizigül et al., 1995). The structure of the aglycone of **1** was thus recognized to be the triterpene R<sub>1</sub> barrigenol and it was in agreement with the literature data (Fu et al., 2005).

## Discussion

According to obtained results on the neuropharmacological evaluation of *T. sylvatica* fruits, it is not possible to consider that this plant possesses a convincing CNS depressant effect. Despite the aqueous and methanol extracts showed sedative effect in two very well-known sedative models, and these results apparently are in agreement with a previous work (Molina et al., 1999). The aqueous extract obtained from *T. sylvatica* seeds was the most active extract, but it was also the most toxic extract for mice. The neurotoxicity was also evidenced for this extract because it decreased the locomotor activity, disturbed the motor coordination and decreased the exploratory behavior with signs of discomfort for the animals. These results suggest that sedative effect for this plant might be caused more by a toxic effect than by an effect on the CNS. The fruits of *T. sylvatica* are used to prepare the decoctions used as sedative traditional remedies. These fruits are constituted by 40% of seeds and 60% of pericarp. We were

interested in knowing if seeds or pericarp showed the same activity; therefore, we studied separately seeds and pericarp, finding that seeds are more active than pericarp.

From the aqueous seeds extract, the glycoside triterpenoid 28-O-[ $\beta$ -L-6-rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol was isolated as a new natural product. This substance showed also CNS depressant and toxic effect ( $LD_{50} = 1.11 \pm 0.23$  mg/kg). Therefore, these results suggested that this substance is responsible for the sedative and toxic effects of *T. sylvatica* seeds. A preliminary HPLC analysis of the extracts of *T. sylvatica* showed that this glycoside triterpenoid is present in methanol and aqueous extracts of *T. sylvatica* seeds but it was not detected in the extracts of pericarp. Therefore, the activity of this plant may be related to the presence of this glycoside.

Previous pharmacological work did not report any toxic effect for this species, probably since the evaluation was performed in an acute single doses regimen and the experiments were performed in a time less than 3 h (Balderas et al., 2008). On the other hand, the repeated oral administration for 5 d of aqueous extract was less active and less toxic than the single intraperitoneal administration. These results suggest this compound is poorly absorbed from the gastrointestinal tract.

On the other hand, jacaranone was identified as the sedative principle in *T. pringlei* (Lozada-Lechuga et al., 2010). However, Xu and coworkers reported neurotoxic effects for this natural quinone that lead to death of mice in 30–90 min, with a  $LD_{50}$  of 150–200 mg/kg (Xu et al., 2003). Here, we are reporting the triterpene glycoside 28-O-[ $\beta$ -L-6-

rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol as a new natural product and as the second one sedative and toxic principle in *Ternstroemia* genus. Toxic effect seems to be the major effect of fruits of these medicinal plants, and the neuropharmacological effects observed here and those previously reported might be signs of this toxic effect. These findings highlight the need to consider not only the pharmacological effect to support the traditional use of the medicinal plants but also to take in count their toxicity.

In conclusion, we demonstrated that the aqueous extract of *T. sylvatica* seeds, which represent 40% of the fruits, has toxic activity rather than CNS depressant activity in mice and that this effect might be related to the presence of 28-O-[β-L-6-rhamnopyranosyl]-R<sub>1</sub>-barrigenol, a new triterpenoid glycoside.

### Acknowledgements

This work was supported by a grant from DGAPA IN210112 and CONACYT 82613. José Luis Balderas acknowledges fellowship from CONACYT (116413).

### Declaration of interest

There are no conflicts interest related with the present investigation.

### References

- Aguilar-Santamaría L, Tortoriello J. (1996). Anticonvulsant and sedative effects of crude extracts of *Ternstroemia pringlei* and *Ruta chalapensis*. *Phytother Res* 10:531–3.
- Balderas J, Reza V, Ugalde M, et al. (2008). Pharmacodynamic interaction of the sedative effects of *Ternstroemia pringlei* (Rose) Standl. with six central nervous system depressant drugs in mice. *J Ethnopharmacol* 119:47–52.
- Bartholomew B, McVaugh R. (1997). Identification and typification of *Ternstroemia lineata* de Candolle (Theaceae). *Novon* 7:14–16.
- Boissier J, Simon P. (1962). La réaction d'exploration chez la souris. *Therapie* 17:1225–32.
- Boom B. (1989). New species of *Ternstroemia* (Theaceae) from Guayana Highland. *Brittonia* 41:136–42.
- Fu G, Wang Y, Gao S, et al. (2005). Five new cytotoxic triterpenoid saponins from the roots of *Symplocos chinensis*. *Planta Med* 71: 666–72.
- González-Trujano M, Navarrete A, Reyes B, Hong E. (1998). Some pharmacological effects of the ethanol extract of leaves of *Annona diversifolia* on the central nervous system in mice. *Phytother Res* 12: 600–2.
- Hiller K, Zetler G. (1996). Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis* L.: Behavioral and anticonvulsant properties. *Phytother Res* 10:145–51.
- Ikuta A, Tomiyasu H, Morita Y, Yoshimura K. (2003). Ursane- and oleanane-type triterpenes from *Ternstroemia gymnantheracallus* tissues. *J Nat Prod* 66:1051–4.
- Jo Y, Suh J, Shin M, et al. (2005). Jacaranone and related compounds from the fresh fruits of *Ternstroemia japonica* and their antioxidative activity. *Arch Pharm Res* 28:885–8.
- Kikuchi K, Yamaguchi M. (1974). The structure of ternstroemioxantina, a new aldehydic C<sub>40</sub>-carotenoid. *B Chem Soc Jpn* 47:885–7.
- Kirmizigül S, Hüseyin H, Rose M. (1995). Triterpenoid glycosides from *Cephalaria transsylvanica*. *Phytochemistry* 39:1171–4.
- Kobuski C. (1942). Studies in the Theaceae – XIII. Notes on the Mexican and Central American species of *Ternstroemia*. *J Arnold Arboretum* 23:464–78.
- Lozada-Lechuga J, Villareal M, Fliniaux M, et al. (2010). Isolation of jacaranone, a sedative constituent extracted from the flowers of the Mexican tree *Ternstroemia pringlei*. *J Ethnopharmacol* 127: 551–4.
- Molina M, Contreras C, Téllez-Alcántara P, Rodríguez F. (1999). Sedative action of *Ternstroemia sylvatica* in the male rat. *Phytomedicine* 6:115–18.
- Oliva I, González-Trujano M, Arrieta J, et al. (2004). Neuropharmacological profile of hydroalcoholic extract of *Valeriana edulis* ssp. *procera* roots in mice. *Phytother Res* 18: 290–6.
- Rolland A, Fleurentin J, Lanhers MC, et al. (1991). Behavioral effects of the American traditional plant *Eschscholzia californica*: Sedative and anxiolytic properties. *Planta Med* 57:212–16.
- Shin M, Wang W, Nam K, et al. (2003). Triterpenoid saponins from the fruits of *Ternstroemia japonica*. *J Nat Prod* 66:1351–5.
- Tori M, Fukuyama H, Nakashima K, Sono M. (2005). Degraded terpenoids and aromatic compounds from *Ternstroemia gymnanthera*. *Lett Org Chem* 2:262–4.
- Tortoriello J, Romero O. (1992). Plants used by Mexican with presumable sedative properties: An ethnobotanical approach. *Arch Med Res* 23:111–16.
- Ugalde M, Reza V, González-Trujano ME, et al. (2005). Isobolographic analysis of the sedative interaction between six central nervous system depressant drugs and *Valeriana edulis* hydroalcoholic extract in mice. *J Pharm Pharmacol* 57:631–9.
- Walsh R, Cummins R. (1976). The open-field test: A critical review. *Psychol Bull* 83:482–504.
- Xu H, Zhang N, Casida JE. (2003). Insecticides in Chinese medicinal plants: Survey leading to Jacaranone, a leurotoxicant and glutathione-reactive quinol. *J Agric Food Chem* 51:2544–7.