

Efecto del extracto hidroalcohólico de *Dracocephalum moldavica L.* como antidepresivo probado en ratones Cd-1

Jiménez Zúñiga Marcos Ignacio¹, Gómez y Gómez Yolanda de las Mercedes¹,
Bautista Ramírez María Esther¹, Ramírez Sotelo María Guadalupe²

¹Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología

²Departamento de Bioprocesos¹, Departamento de Bioingeniería.
Av. Acueducto de Guadalupe s/n, Gustavo A. Madero
Barrio La Laguna Ticomán, Ciudad de México, D.F. CP 07340.

mjimenez.zuniga@hotmail.com

Fecha de aceptación: 10 de julio de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (2014), se reporta que 340 millones de personas sufren depresión en el mundo. La depresión es la alteración del estado de ánimo. De acuerdo con ello, los tratamientos para contrarrestar esta patología actualmente están basados en fármacos antidepresivos que presentan un gran número de efectos adversos. El presente trabajo describe el efecto del extracto de *Dracocephalum moldavica L.* a una dosis de 80 mg/Kg, utilizando ratones machos de la cepa CD-1, como una alternativa en el tratamiento de la depresión. De la planta pulverizada, se realizó una extracción con 40 mL de hexano y metanol-agua (9:1) para el tamiz fitoquímico, encontrándose alcaloides, flavonoides, azúcares reductores, taninos, glicósidos cardíacos y cianogénicos, saponinas y esteroides. Para las pruebas de la actividad antidepresiva se obtuvo el extracto total con una solución hidroalcohólica (1:9). Los resultados de la Prueba de Nado Forzado del modelo experimental fueron: inmovilidad 52.4±19.26 [s/5min], nado 145.2±21.85 [s/5min] y escalamiento 102.4±17.84 [s/5min], mientras que el grupo control presentó inmovilidad 178.8±31.35 [s/5min], nado 48±14.81 [s/5min] y escalamiento 73.2±25.70 [s/5min].

Palabras clave: depresión, metabolitos, extractos, nado forzado.

ABSTRACT

WHO (2014) it reported that 340 million people worldwide suffer depression. Depression is a mood disorder. Accordingly treatments to counteract this disease are currently based antidepressant drugs having a number of adverse effects. This paper describes the effect of extract *Dracocephalum moldavica L.* at a dose 80 mg/Kg, using male mice CD-1 strain, as an alternative in the treatment of depression. Of pulverized plant, the extraction was obtained with 40 mL of hexane and methanol-water (9:1), for phytochemical screening were found alkaloids, flavonoids, reducing sugars, tannins, cardiac glycosides and cyanogenic found saponins and steroids. For test of antidepressant activity was obtained the total extract with a hydroalcoholic solution (1:9). The results of the Forced Swimming test experimental model were: immobility 52.4±19.26 [s/5min], swimming 145.2±21.85 [s/5min] and climbing 102.4±17.84 [s/5min], while the control group showed immobility of 178.8±31.35 [s/5min], swimming 48±14.81 [s/5min] and climbing 73.2±25.70 [s/5min].

Key words: depression, metabolites, extracts, forced swimming.

INTRODUCCIÓN

La depresión es una respuesta a las variaciones habituales del estado de ánimo y de las respuestas emocionales a los problemas de la vida cotidiana. Puede convertirse en un problema de salud serio, especialmente cuando es de larga duración e intensidad moderada a grave, y puede causar gran sufrimiento y alterar las actividades laborales, escolares y familiares (OMS, 2014).

En México se estima que los trastornos neuropsiquiátricos ocupan el quinto lugar como enfermedad, que considera indicadores de muerte prematura y días vividos con discapacidad. De acuerdo con Frenk (1999), cuatro de las diez enfermedades más discapacitantes son neuropsiquiátricas: esquizofrenia, depresión, trastorno obsesivo-compulsivo y alcoholismo. Los tratamientos para este tipo de patología están basados en medicamentos del tipo alopático, pero recientemente se han incluido tratamientos que se basan en productos naturales o del tipo herbolario (Frenk, 1999).

La búsqueda de nuevos compuestos o principios activos se basa en el estudio de las plantas medicinales como alternativa de la medicina alopática; las plantas medicinales son aquellos vegetales que sintetizan principios activos que ejercen una acción farmacológica, benéfica o perjudicial, sobre el organismo vivo (Muñoz, 2002).

Los objetivos del presente trabajo fueron obtener metabolitos secundarios de *Dracocephalum moldavica* L., cuantificarlos y realizar la Prueba de Nado Forzado en ratones machos de la cepa CD-1 para demostrar su actividad antidepresiva.

METODOLOGÍA

La parte aérea (tallo, hoja y flor) de *Dracocephalum moldavica* L. (20 g) se sometió a secado en una estufa a una temperatura máxima de 40 °C durante 24 horas. La planta fue molida hasta obtener polvos finos. Los componentes activos fueron extraídos usando una mezcla hidroalcohólica (1:9), el extracto se sónico (Ultrasonic cleaner AS3120B) durante 15 minutos para obtener el 95% de los componentes activos. El extracto se filtró, mientras que a los sólidos se les sometió a una segunda extracción para obtener el 5% restante. Finalmente el líquido fue concentrado en un Rotavapor Buchi R-3 manual, a una temperatura de 50 °C y 150 rpm, para eliminar la mayor parte del etanol.

Para realizar el tamiz fitoquímico se pesaron 5 g de la planta pulverizada de *Dracocephalum moldavica* L. y se añadieron 40 mL de hexano y 40 mL de solución metanol-agua (9:1). La mezcla se sónico durante 15 minutos (Ultrasonic cleaner AS3120B), se filtró el líquido y se separó el extracto en dos fases una polar (metanol-agua) y otra no polar (hexano) (Valencia *et al.*, 2010).

Al término del tamiz fitoquímico se procedió a la cuantificación de los metabolitos secundarios que presentaron positivos en las pruebas cualitativas y los ensayos de cuantificación se realizaron siguiendo las referencias de la tabla 1.

Tabla 1. Cuantificación de metabolitos secundarios del extracto de *Dracocephalum moldavica* L.

Referencia	Estándar de referencia	Cuantificación
Singleton y Rossi, 1965	Acido gálico	Fenoles
Makkar <i>et al.</i> , 1993	Acido tánico	Taninos
Chang <i>et al.</i> , 2002	Quercetina	Flavonoides
Walter <i>et al.</i> , 1989	Colesterol	Esteroides
Fazel <i>et al.</i> , 2010	Cafeína	Alcaloides
Re <i>et al.</i> , 1999	Trolox	Antioxidante (método ABTS)
Brand-williams <i>et al.</i> , 1995	Trolox	Antioxidante (método DPPH)

Experimentos *in vivo*

En 1977 Porsolt *et al.*, desarrollan un modelo para el estudio de la depresión usando un cilindro de 40 cm x 18 cm (altura/longitud), donde se introduce al animal, sin posibilidades de escapar. Luego de un período de movimiento vigoroso, el animal se acomoda en una postura inmóvil, dejando la cabeza fuera del agua para respirar. Esta inmovilidad representa un estado de depresión y desesperación que puede ser revertida mediante un tratamiento con antidepressivos.

Cada animal permanecerá 15 minutos en el agua (temperatura 25 ± 1 °C) y luego otros 15 minutos en un ambiente a 32 ± 1 °C para secarse antes de volver a su jaula. La inmovilidad está definida como el periodo en el que el roedor solo hace los movimientos necesarios para mantener la cabeza sobre el nivel del agua y no hace intentos para escapar (Ej.: “swimming”, “paddling”, “climbing”, “diving”). Estos intentos de escape o conductas activas (específicamente el “climbing” y el “swimming”) fueron susceptibles a tratamientos con fármacos. Esto indicaría que las conductas activas de la Prueba de Nado Forzado son factibles de ser cuantificadas.

Se ocuparon ratones machos de la cepa CD-1 de entre 18-20 g de peso, los ratones fueron colocados individualmente en cilindros de vidrio modificando el método de Porsolt *et al.*, 1977 donde el cilindro mide (altura: 40 cm, diámetro: 20 cm) que contienen 30 cm de agua a 25 ± 1 °C. Todos los animales se ven obligados a nadar por un período de 15 minutos (pre-test), seguidas de una sesión de 5 minutos (test) a las 24 horas después (Murakami *et al.*, 2009). Sobre esta base, 3 grupos independientes de ratones (n=5) se utilizaron en este experimento. De acuerdo con Martínez *et al.*, (2012) usando concentraciones de entre 10 y 100 mg/Kg puede haber una reducción en la inmovilidad en la Prueba del Nado Forzado por lo que en el presente trabajo se decidió trabajar con: un grupo con el extracto con 80 mg/Kg 24, 6 y 1 hora antes de la prueba, otro grupo fue administrado con 15 mg/Kg del fármaco imipramina 24, 6 y 1 hora antes de la prueba, mientras que un grupo independiente sin administración se utilizó como control.

Después de las sesiones de natación, los ratones fueron retirados del cilindro, se secaron cuidadosamente, se colocaron en jaulas a una temperatura de entre 30-35 °C durante 20 min y luego fueron devueltos a sus jaulas. Todas las sesiones de prueba fueron grabados en vídeo y el tiempo de inmovilidad acumulada se registró (Porsolt *et al.*, 1977a; Xu *et al.*, 2005; Schürmann da Silva *et al.*, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 2, se muestra el resultado del tamiz fitoquímico donde se observan los metabolitos secundarios presentes, la reacción que se ocupó y las pruebas que presentaron positivas.

Tabla 2. Resultados del tamiz fitoquímico *Dracocephalum moldavica* L..

Metabolito	Reacción	<i>Dracocephalum moldavica</i> L.
Alcaloides	Dragendorff	+-
	Wagner	-
	Mayer	-
Flavonoides	Shinoda	+ Auronas y Chalconas
	Hidróxido de sodio al 10%	+ Xantonas y Flavonas
Cumarinas	Erlich	-
	Hidróxido de amonio	-
Sesquiterpenlactonas	Hidroxamato férrico	-
Azúcares Reductores	Fehling	+-

	Benedict	-
Taninos	Cloruro férrico	+ Catecol
Glicósidos cardíacos	De Legal	+
	De Baljet	-
Glicósidos cianogénicos	Grignard	+/-
Quinonas	Ácido sulfúrico	-
Saponinas	Lieberman-Bouchard	+ Triterpenoides
	Rosenthaler	+ Triterpenoides
Esteroides	Lieberman-Bouchard	+ Esteroides

NOTA: + presencia, +/- poca presencia, - negativo.

Del tamiz fitoquímico del extracto de *Dracocephalum moldavica L.*, las pruebas positivas obtenidas fueron: esteroides, azúcares reductores, taninos, glicósidos cardíacos y cianogénicos, saponinas, alcaloides y flavonoides, éstos dos últimos metabolitos secundarios son los de interés farmacológico en especial para enfermedades relacionadas con el Sistema Nervioso Central (SNC) como lo menciona Estrada-Reyes *et al.* (2012).

Los flavonoides interactúan de manera directa y/o indirecta con los sistemas esenciales de neurotransmisión cerebral, modulan la actividad de diversas enzimas en las cascadas de señalización de procesos tan importantes como el de la memoria y el aprendizaje, promoviendo un mejor funcionamiento neuronal, por lo que es importante entender cómo influyen en la función cerebral (Estrada-Reyes *et al.*, 2012).

Una vez obtenido el tamiz fitoquímico se cuantificó cada uno de los metabolitos secundarios presentes en el extracto de *Dracocephalum moldavica L.*, la cuantificación se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Cuantificación de metabolitos secundarios presentes en *Dracocephalum moldavica L.*

Metabolito	Cuantificación
Fenoles	0.187±0.021 C _{Fenoles} [mg eq. De ácido gálico /1g de muestra]
Taninos	13.603±0.029 C _{Taninos} [mg eq. De ácido tánico/1g de muestra]
Flavonoides	36.961±0.065 C _{Flavonoides} [µg eq. De quercetina /1g de muestra]
Esteroides	1.137±0.003 C _{Esteroides} [mg eq. De colesterol /1g de muestra]
Alcaloides	1.109±0.030 C _{Alcaloides} [mg eq. De cafeína/1g de muestra]
Antioxidantes (método ABTS)	98±0.093 % de inhibición
Antioxidantes (método DPPH)	88.687±0.048 % de inhibición

Con la cuantificación de metabolitos se probó el extracto de *Dracocephalum moldavica L.* actúa como antidepresivo, usando la Prueba de Nado Forzado de Porsolt *et al.*, 1977a.

Los resultados obtenidos para la evaluación de la inmovilidad se muestra en la figura 1, y en donde, los animales expuestos al extracto de *Dracocephalum moldavica L.* presentaron un tiempo de inmovilidad de 52.4±19.26 [s/5min], tiempo menor respecto al grupo control, con un tiempo de inmovilidad de 178.8±31.35 [s/5min]; por otra parte, el extracto presentó valores semejantes al fármaco control (imipramina) que fue de 24.75±10.46 [s/5min], indicando que entre mayor sea el tiempo de movimiento por parte de los ratones no hay depresión, sugiriendo con ello, que los extractos tienen actividad antidepresiva.

El hecho de que los antidepresivos disminuyan la duración de la inmovilidad en la Prueba del Nado Forzado de forma aparentemente específica (Porsolt, 1981), propone a esta prueba como modelo para detectar actividad antidepresiva. Esta aplicación se basa en el supuesto de que cualquier sustancia o

tratamiento que actuó como los antidepresivos reconocidos, esto es, que reduzca la duración de la inmovilidad es, al menos en potencia, un agente antidepresivo (Borsini et al., 1988).

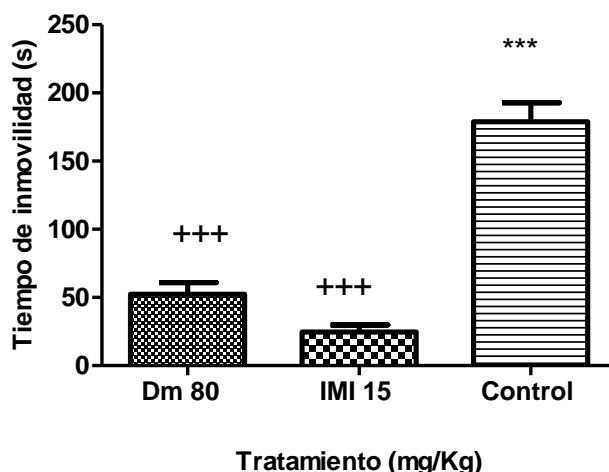


Figura 1. Evaluación de la inmovilidad del extracto de *Dracocephalum moldavica* L. (Dm) 80 mg/Kg, imipramina (IMI) 15 mg/Kg y el grupo control, los valores indican la media \pm DS de una $n=5$ por duplicado en cada grupo con $p < 0.0001$ * relación a IMI y + con el control, ANOVA de una vía DUNNETT.

Los datos obtenidos en la evaluación del nado se observan en la figura 2 donde el extracto de *Dracocephalum moldavica* L. presentó un tiempo de natación de 145.2 ± 21.85 [s/5min]; esta conducta se confirmó al realizar una segunda evaluación de la actividad antidepresiva de los extractos, ya que éstos tienen tiempos de nado mayores al control que fue de 48 ± 14.81 [s/5min], el nado nos indica que los ratones no se encuentran depresivos; este resultado confirma la actividad ya que tiene similitud con el grupo de ratones a los que se les administró el fármaco (imipramina) cuyo tiempo de natación fue de 143.8 ± 29.23 [s/5min], concluyendo que ambos presentaron tiempos de nado mayores al grupo control.

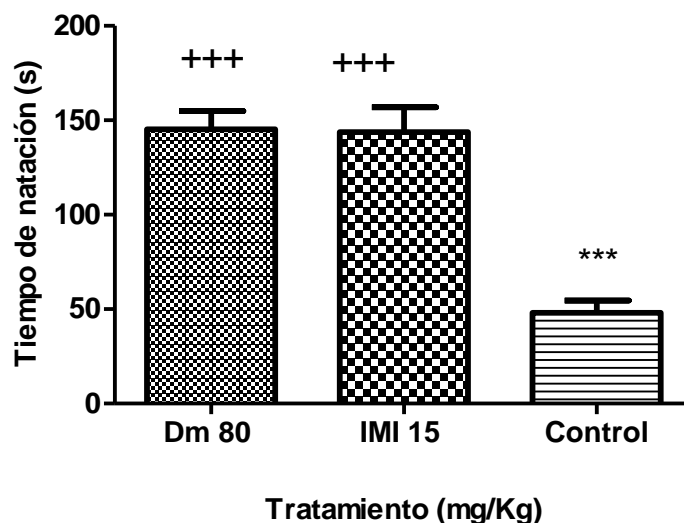


Figura 2. Evaluación de la natación del extracto de *Dracocephalum moldavica* L. (Dm) 80 mg/Kg, imipramina (IMI) 15 mg/Kg y el grupo control, los valores indican la media \pm DS de una $n=5$ por duplicado en cada grupo con $p < 0.0001$ * relación a IMI y + con el control, ANOVA de una vía DUNNETT.

En cuanto a la evaluación del escalamiento (Fig. 3), el extracto presentó un tiempo de 102.4 ± 17.84 [s/5min] respecto al grupo control que fue de 73.2 ± 25.70 [s/5min]; esta evaluación nos indica por cuánto tiempo el ratón intenta escapar del cilindro donde se encuentra nadando. Ambos datos fueron comparados con el grupo del fármaco (imipramina) que presentó un tiempo de 117.8 ± 22.46 [s/5min].

La conducta de escalamiento es más sensible a fármacos con acción selectiva sobre la transmisión catecolaminérgica, tales como los antidepresivos tricíclicos del tipo imipramina (Detke *et al.*, 1995; Cryan *et al.*, 2000).

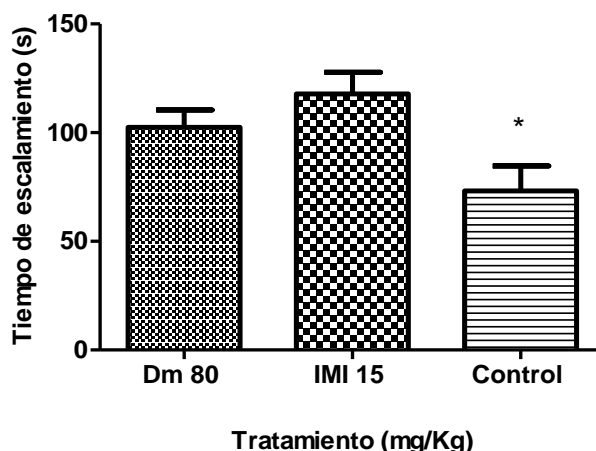


Figura 3. Evaluación del escalamiento del extracto de *Dracocephalum moldavica* L. (Dm) 80 mg/Kg, imipramina (IMI) 15 mg/Kg y el grupo control, los valores indican la media \pm DS de una $n=5$ por duplicado en cada grupo con $p < 0.0238$ * relación a IMI, ANOVA de una vía DUNNETT.

CONCLUSIONES

El estudio fitoquímico de *Dracocephalum moldavica* L., demostró que contiene esteroides, azúcares reductores, taninos, glicósidos cardíacos y cianogénicos, saponinas, alcaloides y flavonoides del tipo auronas, chalconas, xantonas y flavonas.

Al realizar la cuantificación se demostró la cantidad de metabolitos presentes en el extracto, siendo los flavonoides, alcaloides y los antioxidantes los que presentaron mayor porcentaje de metabolitos secundarios presentes, lo que nos indica que en alguno de estos metabolitos secundarios podría estar presente la actividad farmacológica.

El modelo de depresión (Prueba de Nado Forzado), permitió identificar efectos antidepresivos una vez administrado el extracto de *Dracocephalum moldavica* L., la dosis del extracto disminuyó el tiempo de inmovilidad y simultáneamente aumentó la conducta de natación, sin verse afectada la conducta del escalamiento.

REFERENCIAS

- Borsini F., & Meli A. (1988). Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology*, 94: 147-160.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- Chang C. Yang M., Wen H., Chern J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10: 178-182.

- Cryan J. F., Lucky I. (2000). Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-hydroxytryptamine_{2c} receptors. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 295: 1120-1126.
- Detke M. J., Rickels M., Lucki I. (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*, 121: 66-72.
- Estrada-Reyes R., Ubaldo-Suárez D., Araujo-Escalona, A. G. (2012). Los flavonoides y el sistema nervioso central. *Salud Mental*, 35: 375-384.
- Fazel S., Hamidreza M., Rouhollah G., & Verdian-Rizi, M. (2010). Spectrophotometric determination of total alkaloids in some iranian medicinal plants. *Journal of Applied Horticulture*, 12: 69-70.
- Frenk J., Lozano R., González M.A. (1999). Economía y salud: propuesta para el avance del sistema de salud en México. México DF: Fundación Mexicana para la Salud.
- Makkar H. P. S., Blümmel M., Borowy N. K., Becker K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61: 161-165.
- Martínez-Vázquez M., Estrada-Reyes R., Martínez-Laurrabaquio A., López-Rubalcava C., Heinze G. (2012). Neuropharmacological study of dracocephalum moldavica L. (lamiaceae) in mice: Sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 141: 908-917.
- Muñoz F. (2002). Plantas Medicinales y Aromáticas Estudio cultivo y Procesado. Madrid: Grupo Mundi-Prensa.
- Murakami T., Yamane H., Tomonaga S., Furuse M. (2009). Forced swimming and imipramine modify plasma and brain amino acid concentrations in mice. *European Journal of Pharmacology* 602: 73-77.
- OMS, O. M. (Octubre de 2014). Organización Mundial de la Salud OMS. Obtenido de La depresión.
- Porsolt, R. D. (1981). Behavioral despair. En S. J. Enna, J. B. Malick y E. Richelson (Eds.). Antidepressants: Neurochemical, Behavioral and Clinical Perspectives. New York: Raven, pp. 121-139.
- Porsolt R.D., Le Pichon M., Jalfre M. (1977^a). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266: 730-732.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente, A. Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231-1237.
- Schürmann da Silva, A.F., de Andrade, J.P., Bevilacqua, L.R.M., de Souza, M.M., Izquierdo, I., Heriques, A.T., Zuanazzi, J.Á.S., (2006). Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 85: 148-154.
- Singleton V., Rossi J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology Viticulture* 16: 144-58.
- Valencia del T. G., Garín A. M. E. (2010). Manual de Prácticas de Productos Naturales. México: UPIBI-IPN, p. 28-37
- Walter F Galindo, Mauricio Rosales, Enrique Murgueitio y Jesús E Larrahondo. (1989). Sustancias antinutricionales en las hojas de guamo, nacedero y matarratón. *Livestock Research for Rural Development*.
- Xu, Y., Ku, B.-S., Yao, H.-Y., Lin, Y.-H., Ma, X., Zhanf, Y.-H., Li, X.-J. (2005). The effects of curcumin on depressive-like behavior in mice. *European Journal of Pharmacology* 518: 40-46.