

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD, ACTIVIDAD SEDANTE Y ANSIOLÍTICA
DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS FLORES DE *Erythrina berteroana* (PITO)
EN RATONES NIH

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

JESSICA AMANDA BONILLA RODRÍGUEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA.

MARZO, 2013

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LICDO. FRANCISCO REMBERTO MIXCO

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

COORDINADORA GENERAL

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE ÁREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza

ASESORA DE ÁREA DE GESTIÓN AMBIENTAL: TOXICOLOGÍA Y QUÍMICA LEGAL

Licda. María Luisa Ortiz de López.

DOCENTES DIRECTORES

Dr. Marvin José Núñez Rivas

Licda. Ana Miriam Santamaría de Campos

Licdo. Miguel Ángel Moreno Mendoza

AGRADECIMIENTOS

“Todo lo puedo en Cristo que me fortalece” (Filipenses 4:13)

A Dios: Quién me dio la vida, Quién es mi inspiración.

A mi madre, Dora Esperanza Rodríguez Cruz, por acompañarme en cada momento de mi vida, por su apoyo y sus consejos, por estar a mi lado en cada desvelo, en cada paso que doy y darme palabras de ánimo cuando las necesité.

A mi hermano José Manuel Bonilla Rodríguez, por su cariño, comprensión y compartir cada uno de los momentos importantes que llegan a nuestras vidas.

A mis docentes directores, Licda. Ana Miriam Santamaría de Campos, Dr. Marvin J. Núñez y Licdo. Miguel Moreno, por brindarme su amistad y su apoyo incondicional, por todos los consejos, por compartir su conocimiento, por creer en siempre en mí, su paciencia y su valioso tiempo invertido en esta investigación.

A las asesoras, Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo, Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza y Licda. María Luisa Ortiz de López, por estar dispuestas a brindarme un buen consejo y contribuir al enriquecimiento de la investigación.

A Licdo. Noel Avalos, Licdo. Stanley Rodríguez y Dr. Paul Espinoza, por su amistad y su valiosa colaboración.

A Licda. Nancy González, Licda. Ivonne Arévalo, Licda. Rocío Ruano, Licdo. Eliseo Ayala, Licda. Roxana Callejas de Chacón, gracias por sus consejos, su apoyo y su amistad.

A todas las personas que laboran en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, de la Facultad de Química y Farmacia; y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador, por estar acompañándome en el desarrollo de esta investigación, por brindarme su amistad. Gracias.

A cada una de las personas que me brindaron su ayuda incondicional y su amistad, Rocío Guerra, Melany Murillo, Silvia Pérez Martínez, Dalila García, José Guillermo Mejía Valencia, Luis Gómez, Daniel Alvarenga, José Montesinos y Raúl López.

A mis amigos, Rhina Ayala Paiz, Ana María Turish, Raúl Serpas, Diana Portillo, Guillermo Mendoza, Zaída Álvarez, Michelle Quevedo y Fátima Saravia, por acompañarme siempre, apoyarme en mis decisiones y su amistad incondicional.

A Enrique Aragón, Lissette López, Sonia Rendón, Luci Torres, Susana Hernández Doño, Mezly Calvo, Katia López, Carolina Cortez, Katia Salazar, Tania Montoya y Claudia Torres. Gracias por estar pendientes del desarrollo de la investigación y su amistad.

A mis amigas, Alejandra Zuniga, Diana García, Natalia Ramos, Gabriela García, Eloisa Morán, Jessie Abullarade, Linda Molina, Ligia Sibrián y Nora Díaz, gracias por brindarme tan linda amistad, por escucharme siempre y acompañarme en oración durante la investigación y siempre.

A los jóvenes Kairos Hubs, gracias por su amistad, apoyo y sus oraciones. Muchas Gracias.

Jessica Amanda Bonilla Rodríguez

DEDICATORIA

“Y sabemos que los que aman a Dios, todas las cosas les ayudan a bien, esto es, a los que conforme a su propósito son llamados” (Romanos 8:28)

A Dios, mi Padre del Cielo, siempre cumple su promesa cada mañana.

A mi madre, Dora Rodríguez, además de mi madre, una amiga que esta siempre dispuesta a escucharme, la que me apoya en mis decisiones, la que estuvo pendiente de cada detalle de mi carrera universitaria.

A mi amada Tía, Marta Rodríguez de Ponce (Q.D.D.G), quién estuvo pendiente de mi, por sus palabras de aliento y sus consejos. Siempre estará en mi corazón.

A los investigadores: Licda. Ana Miriam Santamaría de Campos, Dr. Marvin J. Núñez y Licdo. Miguel Moreno, quienes dedicaron su tiempo en la realización de esta investigación y fueron la mejor guía que pude tener. Los admiro y aspiro a ser algún día, una verdadera profesional como lo son ustedes. Gracias.

A mi familia, Amanda Rodríguez de Merlos, Julio Rodríguez, Orlando Rodríguez, Miguel Rodríguez, Héctor Merlos y Milton Merlos, quienes me han dado su cariño y han estado presentes en los momentos más importantes de mi vida.

A la demás familia y amigos, quienes siempre estuvieron dispuestos a ofrecerme su ayuda, sus consejos y oraciones.

Jessica Amanda Bonilla Rodríguez

Índice

RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	xviii
2. OBJETIVOS	
3. MARCO TEÓRICO	22
3.1. Generalidades de <i>Erythrina berteroana</i> (pito).	22
3.1.1. Género <i>Erythrina</i>	22
3.1.2. <i>Erythrina berteroana</i> (pito)	25
3.2. Generalidades de los alcaloides	31
3.2.1. Historia	31
3.2.2. Estado natural y distribución.	32
3.2.3. Localización de los alcaloides	33
3.2.4. Función de los alcaloides en el vegetal	33
3.2.5. Propiedades fisicoquímicas	34
3.2.6. Estructura química	35
3.2.7. Clasificación	36
3.2.8. Nomenclatura	41
3.2.9. Detección y extracción de los alcaloides	42
3.3. Alcaloides del Erythrinano	46
3.3.1. Biosíntesis	50
3.3.2. Alcaloides del género <i>Erythrina</i>	53
3.4. Generalidades de métodos de extracción, fraccionamiento y separación de productos naturales.	61
3.4.1. Métodos extractivos a partir de la droga.	62
3.4.2. Métodos de separación de metabolitos secundarios de la droga	69
3.5. Generalidades del insomnio	72
3.5.1. Diagnóstico del insomnio	75
3.5.2. Clasificación del insomnio	77

3.5.3. Insomnio asociado a enfermedades neurológicas	78
3.5.4. Tratamiento del insomnio	78
3.6. Generalidades de la ansiedad	81
3.6.1. Origen de la palabra ansiedad	82
3.6.2. Principales síntomas de la ansiedad	83
3.6.3. Clasificación de los tipos de trastornos de ansiedad	84
3.6.4. Tratamiento para los trastornos de ansiedad	86
3.7. Métodos de ensayo en toxicología	89
3.8. Uso de animales de experimentación	89
3.9. Ratón de laboratorio	90
3.10. Lineamientos para pruebas de productos químicos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE).	91
3.10.1. Toxicidad aguda oral	92
3.10.2. Toxicidad sub-aguda oral por administración continua (28 días) vía oral	94
3.11. Pruebas para evaluar la actividad ansiolítica en ratones	94
3.11.1. Pruebas no condicionadas	95
3.12. Prueba de sueño inducido para evaluar la actividad sedante	97
4. DISEÑO METODOLÓGICO.	99
4.1. Tipo de estudio	99
4.2. Investigación bibliográfica	100
4.3. Investigación de campo	100
4.4. Parte Experimental. Investigación de laboratorio	101
4.4.1. Obtención del extracto acuoso de las flores de <i>Erythrina berteriana</i> e identificación de alcaloides	101
4.4.2. Determinación de toxicidad del extracto acuoso liofilizado	104
4.4.3. Actividad biológica: actividad sedante y ansiolítica.	110
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	119
5.1. Identificación de Alcaloides	119
5.1.1. Pruebas químicas de precipitación:	119

5.1.2. Cromatografía en capa fina:	120
5.2. Ensayo de toxicidad subaguda por administración continua (28 días) vía oral dosis límite de 2000 mg/kg de peso.	123
5.2.1. Observaciones clínicas y comportamiento del peso corporal	123
5.2.2. Examen macroscópico de los órganos	124
5.2.3. Exámenes hematológicos	126
5.2.4. Exámenes histopatológicos.	127
5.3. Determinación de la actividad sedante	129
5.3.1. Sueño inducido por pentobarbital sódico	129
5.3.2. Determinación de la actividad ansiolítica	130
6. CONCLUSIONES	140
7. RECOMENDACIONES	144
BIBLIOGRAFÍA	
GLOSARIO	
ANEXOS	

Índice de figuras

FIGURA Nº	Pág.
1. Mapa de la Distribución de <i>Erythrina berteroana</i> .	25
2. Flores de <i>Erythrina berteroana</i> .	26
3. Árbol de <i>Erythrina berteroana</i> , hojas y fruto	28
4. Alcaloides con nitrógeno no heterocíclico	37
5. Clasificación de alcaloides en base a su estructura	38
6. Alcaloides derivados de la fenilalanina y tirosina	39
7. Alcaloides Diversos	39
8. Alcaloides derivados de la ornitina y lisina.	40
9. Alcaloides derivados del triptófano	41
10. Esqueleto del Erythrinano	46
11. Estructura de los alcaloides diénicos	47
12. Estructura de los alcaloides alquénicos	47
13. Estructura de los alcaloides lactónicos.	48
14. Alcaloides elucidados en 1963 por J. R. Hanson	49
15. Ruta de Biosíntesis de los alcaloides del género <i>Erythrina</i> .	51
16. Ruta de biosíntesis de los alcaloides diénicos	52
17. Ruta de biosíntesis de los alcaloides lactónicos.	52
18. Alcaloides presentes en <i>Erythrina berteroana</i>	55

FIGURA N°	Pág.
19. Alcaloides presentes en <i>Erythrina melanacantha</i> y en <i>Erythrina variegata</i> .	57
20. Biosíntesis de Erymelantina a partir de Erysovina	57
21. Alcaloides presentes en <i>Hyperbaeria columbica</i>	58
22. Alcaloide presente en varias especies del género <i>Erythrina</i>	59
23. O-metilación de 11 β -metoxierysodina	59
24. Alcaloides de <i>E. cochleata</i> y <i>E. brucei</i>	60
25. Aparato de destilación de arrastre de vapor	63
26. Proceso de maceración	65
27. Aparato de reflujo	66
28. Aparato de percolación	67
29. Aparato Soxhlet	68
30. Realización de una cromatografía en capa fina	71
31. Procedimiento de la realización de la cromatografía en capa fina	71
32. Fases del sueño tipo REM y NO REM	74
33. Aparato liofilizador	102
34. Micrótopo rotatorio (equipo para realizar cortes histológicos)	109
35. Administración vía intraperitoneal	111
36. Potenciación del sueño	112

FIGURA N°	Pág.
37. Prueba de enterramiento de esferas	113
38. Prueba de Enterramiento de esferas	114
39. (a) Plataforma agujereada; (b) Realización de la prueba	115
40. Laberinto en cruz elevado	117
41. Evidencia positiva para las pruebas químicas de precipitación de alcaloides	120
42. Cromatografía en capa fina. Vista en cámara con lámpara U.V.	121
43. Cromatografía en capa fina. Evidencia positiva al revelar con Dragendorff	121
44. Cromatografía en capa fina. Evidencia positiva al revelar con Dragendorff	122
45. Periodo de sueño. Prueba de Sueño inducido	129
46. Enterramiento de esferas	131
47. Suelo agujereado	133
48. Laberinto en cruz elevado. Porcentaje de entradas a zonas abiertas	135
49. Laberinto en cruz elevado. Porcentaje de tiempo en zonas abiertas	136

Índice de tablas

Tabla N°	Pág.
1. Usos Medicinal de <i>Erythrina berteroana</i>	30
2. Evidencia positiva para las pruebas de precipitación para alcaloides	103
3. Condiciones para realizar cromatografía en capa fina.	103
4. Descripción de parámetros de toxicidad en animales de experimentación	106
5. Resultados para las pruebas químicas de precipitación para la identificación de alcaloides.	119
6. Toxicidad subaguda. Variación de los valores promedios de peso corporal (g) de grupos experimentales	124
7. Toxicidad subaguda. Valores promedio de peso de órganos en gramos	125
8. Toxicidad subaguda. Hematología. Valores de significancia de la diferencia entre los grupos tratamiento y centinela respecto a los grupos control.	127

Índice de anexos

Anexo N°

1. Carta de jardín botánico la laguna
2. Procedimiento para la clasificación de una sustancia toxica
3. Fórmula general para determinar la cantidad de extracto acuoso liofilizado para preparar cualquier dosis mg/Kg de peso corporal
4. Evolución del peso corporal por grupo experimental en el ensayo de toxicidad subaguda a 28 días.
5. Ensayo de toxicidad subaguda a 28 días. Registro de peso corporal.
6. Registro de peso de órganos.
7. Registro de datos hematológicos.
8. Procesamiento de tejidos para los exámenes histopatológicos
9. Extracción de sangre de Seno Retro-orbital
10. Prueba de enterramiento de esferas
11. Prueba de laberinto en cruz elevado
12. Suelo agujereado
13. Sueño Inducido por pentobarbital sódico

RESUMEN

El presente trabajo de graduación es una investigación preliminar, orientada a contribuir al conocimiento fitoquímico, toxicológico y farmacológico de la flor de ***Erythrina berteroana*** (pito), especie popularmente utilizada; además pretende aportar las primeras bases científicas a nivel nacional que validen las propiedades neurolépticas atribuidas tradicionalmente a dicha especie, la cual está ampliamente distribuida en el país.

A través de métodos fitoquímicos se determinó la presencia de alcaloides en el extracto acuoso liofilizado de las flores de ***Erythrina berteroana*** los cuales son característicos de las especies del género ***Erythrina***. Posteriormente se evaluó la toxicidad del extracto mediante el uso de modelos animales (ratones albinos NIH) administrando vía oral una dosis límite de 2000 mg/Kg de peso corporal durante 28 días, al mismo tiempo se realizan chequeos clínicos diarios con el fin de identificar signos tóxicos; finalizado este período se realizaron exámenes hematológicos, macroscópicos e histopatológicos de los órganos internos de cada uno de los animales sometidos al ensayo. El extracto acuoso liofilizado de las flores de ***Erythrina berteroana*** a la dosis administrada no causa efectos significativos bajo nuestras condiciones de laboratorio.

Luego se determina las propiedades farmacológicas: sedante y ansiolítica. En la evaluación de la actividad ansiolítica se realizaron las siguientes pruebas: suelo agujereado, laberinto en cruz elevado y enterramiento de esferas; donde se somete al ratón a una situación conflictiva o difícil, ya que este modelo animal manifiesta miedo en un ambiente no familiar o desconocido y un comportamiento explorador disminuido, dicho comportamiento desaparece ante una sustancia ansiolítica. La actividad sedante se evalúa mediante la prueba de sueño inducido; para cada una de las pruebas biológicas mencionadas

anteriormente, se forman 5 grupos experimentales: control negativo, control positivo utilizando como fármaco referencia al diazepam y 3 grupos tratados con la sustancia de ensayo a 100, 250 y 500 mg/Kg de peso corporal. Adicionalmente en la prueba de sueño inducido, se utiliza como fármaco hipnótico al pentobarbital sódico.

Los resultados muestran que, el extracto acuoso de las flores de ***Erythrina berteroana*** (pito) utilizado, presenta actividad ansiolítica levemente efectiva conforme aumenta la dosis administrada durante las pruebas, dicho efecto se observa por el aumento en la actividad exploratoria en todos los animales tratados con la sustancia de ensayo, observando este comportamiento más acentuado en las hembras, efecto característico de los fármacos neurolépticos; por lo cual se podría afirmar que las flores de ***Erythrina berteroana*** sometidas a ensayo poseen propiedades ansiolíticas, mas no así propiedades sedantes, las cuales durante su evaluación se observó que el extracto acuoso ejerce una acción contraria disminuyendo el tiempo de sueño.

A pesar de los resultados obtenidos en la presente investigación, estos no son concluyentes, ya que es un estudio preclínico de esta especie vegetal con fines terapéuticos, además no está definida la dosis que puede causar efectos tóxicos en humanos, por lo que se recomienda evitar su consumo excesivo y con especial cuidado en la administración de preparados caseros para niños, quienes podrían ser los más susceptibles a sufrir algún tipo de daño.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La biodiversidad y la tradición han permitido el uso de las plantas con fines medicinales desde hace muchos años; siendo los extractos de órganos de plantas, los utilizados por un gran porcentaje de la población salvadoreña como remedios caseros para su atención primaria en salud. En los últimos años, la investigación y desarrollo de drogas de origen vegetal ha cobrado una especial importancia por la exhortación hecha por la Organización Mundial de la Salud en el sentido de que cada país utilice todos sus recursos en pro de la atención primaria en salud, es por esto que la evaluación toxicológica y farmacológica de una de las plantas salvadoreñas de consumo común, aporta datos científicos confiables para la continuidad del uso folklórico, de modo que, permita un mejor tratamiento terapéutico.

El presente trabajo consiste en la determinación de los alcaloides contenidos en el extracto acuoso de las flores de *Erythrina berteroana* (pito) procedentes de una zona central del país, dado que investigaciones anteriores sugieren que dichos compuestos nitrogenados son los responsables de la toxicidad y del efecto farmacológico; estos fueron identificados a través de métodos fitoquímicos. Posteriormente se evaluó la toxicidad, la actividad sedante y ansiolítica mediante pruebas específicas en modelos animales experimentales sensibles.

Finalmente se puede mencionar que la importancia de este tipo de investigación radica no solamente en la aportación de conocimiento científico, sino que a la vez permite promover el uso de plantas medicinales de una manera eficaz en beneficio de la salud salvadoreña.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

“Determinar la toxicidad, actividad sedante y ansiolítica del extracto acuoso de las flores de *Erythrina berteroana* (Pito) en ratones NIH”

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Identificar y recolectar flores de *Erythrina berteroana* (pito).

2.2.2. Obtener el extracto acuoso liofilizado de las flores de *Erythrina berteroana* (pito).

2.2.3. Determinar por métodos fitoquímicos la presencia de alcaloides en el extracto obtenido.

2.2.4. Determinar la toxicidad aguda oral y subaguda a 28 días del extracto acuoso liofilizado sobre ratones NIH de ambos sexos.

2.2.5. Evaluar la actividad sedante y ansiolítica del extracto acuoso liofilizado en ratones NIH de ambos sexos.

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Generalidades de *Erythrina berteroana* (pito).

3.1.1. Género *Erythrina*

El género *Erythrina* pertenece a la Familia de las Fabáceas (Leguminoseas). El nombre hace referencia al color prevaleciente de las flores y deriva del griego *erythros* que significa rojo. (31)

Este género comprende un amplio rango de variación morfológica y una gran diversidad ecológica. Las 115 especies descritas en el planeta se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales del mundo además en algunas cálidas y templadas, regiones como Sudamérica, Centroamérica, Antillas mayores, Antillas menores y África occidental. Pocas especies son encontradas en zonas templadas: *Erythrina herbacea* y *Erythrina flabelliformis*, son nativas del sur de Estados Unidos. *Erythrina crista-galli* y *Erythrina falcata* se dan en el norte de Argentina.

Constituye una fuente importante de especies utilizadas por la medicina tradicional de los pueblos de diversas regiones del mundo. A nivel mundial son 34 países que usan etnomédicamente, alrededor de 30 especies diferentes de este género. Las especies reportadas con mayor frecuencia son *Erythrina variegata* (19%), *Erythrina abyssinica* (10%), *Erythrina indica* (8%), *Erythrina fusca* (8%) y *Erythrina senegalensis* (7%). (53)

El género ***Erythrina*** está dividido en 5 subgéneros y en 26 secciones, muchas de estas especies han sido estudiadas por su morfología, distribución, farmacología, contenido de alcaloides y aminoácidos y su composición química. ⁽⁵³⁾ Un gran número de metabolitos secundarios, tales como los alcaloides, flavonoides, lectinas y pterocarpanos, se han aislado a partir de especies del género. Dichos metabolitos y algunos extractos presentan actividades biológicas importantes: actividad antiviral, antiinflamatoria, hipnóticas, contra carcinomas gastrointestinales, entre otras. ⁽³¹⁾

Los órganos vegetales de las especies de ***Erythrina*** más utilizados por la medicina tradicional son la corteza, las hojas, las raíces, semillas y flores. Otras partes empleadas son las ramas, el tallo (y sus cortezas), los frutos y la planta entera. La utilización de la savia de la planta fue reportada para la ***Erythrina variegata*** y se ha utilizado para tratamientos de infertilidad en la mujer.

En cuanto a las formas de preparación de extractos vegetales, se puede afirmar que los métodos de extracción más utilizados en un 82%, emplean agua caliente, la decocción y la infusión (36, 27 y 19%, respectivamente). Las diferentes especies del género *Erythrina* se emplean para el tratamiento de alrededor de 60 trastornos diferentes. Las principales propiedades etnomédicas atribuidas a estas especies vegetales son: alivio de dolores (7%); tratamiento de infecciones urinarias, respiratorias, infecciones de los ojos, piel y garganta (7%), para la fiebre (6%), cura de heridas (5%), para el tratamiento de trastornos menstruales (5%), procesos inflamatorios (4%), entre otras. ⁽⁵³⁾

Erythrina berteroana y ***Erythrina cubensis***, a diferencia de las especies anteriores, son usadas por la población por sus propiedades hipnótico-sedante, febrífuga, astringente, diurética y purgante drástico. Por otro lado, las raíces de ***Erythrina cubensis*** se emplean porque se considera que tienen propiedades

sudoríficas. También las hojas son consideradas emenagogas y la decocción de las flores se utiliza en afecciones respiratorias. El jugo de los tallos se aplica en las picadas de los alacranes. ⁽⁵³⁾

En otro sentido, este género también ejerce efecto citotóxico. Se han realizado estudios en 15 especies, de las cuales 5 resultaron ser tóxicas, al menos en los tipos de extractos preparados y la parte de la planta seleccionada para el estudio. De 29 ensayos realizados, sólo en 9 de ellos se obtuvieron los resultados de citotoxicidad, valor que representa el 31%. Es importante señalar que en estos casos los extractos fueron preparados con disolventes orgánicos como metanol, etanol, acetato de etilo y diclorometano.

Existe un reporte de la utilización de especies de ***Erythrina*** como alimento y otros referidos al uso de estas plantas como veneno para animales nocivos al hombre o peces (3% del total de reportes). Para una misma especie puede existir más de un reporte de un mismo compuesto químico pero en diferentes partes de la planta, o bien en la misma parte útil, pero de distintos autores.

Los alcaloides y los flavonoides representan las familias químicas más relevantes presentes en gran cantidad de las especies estudiadas (54 y 28, respectivamente). Un dato interesante lo constituye el tipo de alcaloide presente en especies del género, de un total de 393 reportes de alcaloides, 358 son del tipo isoquinolínico, lo que indica que este tipo de alcaloide es predominante y característico del género ***Erythrina***. ⁽⁵³⁾

3.1.2. *Erythrina berteroana* (pito)

Familia: Fabaceae (Leguminosae)

Nombres comunes: Pito (El Salvador); Pito, Miche, Coralillo (Guatemala); Pitón (Honduras); Elequeme (Nicaragua), Poró, Poró de Montaña (Costa Rica); Gallito (Panamá).

Distribución: Del sur de México y Las Antillas, hasta Costa Rica, posiblemente hasta América del Sur. (Ver Figura N° 1) (5)



Figura N° 1. Mapa de la Distribución de *Erythrina berteroana*. (45)

Hábitat: el pito es un árbol que se encuentra en sitios no muy secos, a veces cerca de los arroyos. Crece en una amplia gama de climas y se adapta a condiciones de suelo de baja fertilidad. (5)

Descripción botánica:

Flores: inflorescencias en racimos terminales erectos, de 12-15 cm. de largo, tienen muchas flores rojas, largas y angostas, pedicelos cortos. El cáliz tubular de 16-26 mm. de largo; hay 5 pétalos desiguales, color rojo o rojo pálido, el estandarte de 5.5 a 9.5 cm. de largo y de 9 a 16 mm. de ancho, doblado, 2 alas más cortas y 2 formando la quilla; 10 estambres desiguales, unidos en un tubo hacia la base y sobre un pedículo (ginóforo) el pistilo. Las flores son polinizadas por colibríes. (Ver Figura N° 2) ⁽⁵⁾



Figura N° 2. Flores de *Erythrina berteroana*

Árbol: alcanza una altura de 14 m. y un diámetro de 14 cm. Se ramifica a poca altura y tiene una capa ancha y redondeada o irregular. El interior del árbol es grueso y blancuzco, a veces amarillento con velas rosadas. La corteza es de color verde a café o rojizo, ligeramente agrietada verticalmente con camellones anchos y puntos verrugosos blancos (lenticelas) en las grietas, a menudo hay prominencias las cuales terminan en una espina. (Ver Figura N° 3).

Hojas: son alternas, trifoliadas tienen de 10 a 36 cm. de largo. El eje central de 2.5 a 20 cm. de largo, ensanchado en la base, tiene dos glándulas en el ápice, dos más entre las hojuelas laterales y a menudo posee espinas. El haz es verde oscuro y el envés verde claro. (Ver Figura N° 3) ⁽⁵⁾

Frutos: son vainas curvas, de 10 a 18 cm. de largo y 1.2 cm. de grueso sobre las semillas; el ápice y la base son de punta muy larga y angosta. Al madurarse, se tornan de color pardo oscuro y se abren por una línea. Se quedan en el árbol por mucho tiempo, mostrando pocas semillas oblongas de 1.1 cm. de largo, color rojo brillante. Aunque las semillas no sean comestibles (son venenosas), su color llamativo atrae a los pájaros que las tragan y las dispersan al vomitarlas o excretarlas. (Ver Figura N° 3) En el comercio se venden unos collares para niños recién nacidos hechos con ellas y se dice que actúan como “contras”, es decir, como amuletos protectores contra los “daños”, especialmente contra el “mal de ojo”.

Madera: es blancuzca, blanda, liviana y débil. En otros países ha servido como sustituto del corcho y para tallar juguetes y otros objetos pequeños. ⁽⁵⁾

Fenología: observado con hojas de abril a diciembre ⁽⁵⁾, con flores de julio a abril, siendo los meses de enero y diciembre los meses con mayor floración.

Se ha observado con frutos todo el año específicamente en junio, a excepción de mayo y noviembre. (46)

Ecología: existe una relación simbiótica entre *Erythrina berteroana* y ciertas hormigas. Posiblemente las glándulas foliares del árbol sirvan de base alimentaria para ellas, las que a cambio protegerían las partes aéreas contra insectos cortadores. (5)



Figura N° 3. Árbol de *Erythrina berteroana*, hojas y fruto.

Parte de la planta que se consume: las flores y los brotes de las hojas tiernas.

(16)

Usos culinarios: los pétalos se agregan a las sopas de carne o de frijoles, teniendo cuidado de quitarles las partes internas (estambres). También se utilizan para preparar tortitas con huevo o carne molida, y pueden ser consumidas cocidas mezcladas con alhuashte molido cocido con agua o fritas con huevo. Las flores y los brotes de hojas se usan para mezclar con sopa de frijoles. Las flores se comen cocidas y se cree que estas dan sueño, sin embargo, es probable que tengan propiedades tóxicas, ya que las semillas son venenosas y suele haber una correlación entre la composición química de ésta parte de la planta. (16)

Usos terapéuticos: contra el insomnio, para aliviar el dolor de cabeza. El extracto y tintura del pito tienen propiedades calmantes muy pronunciadas. (5) Debido a su acción sedativa, las cascaras secas o frescas (corteza) han servido para preparar un cocimiento que alivia el dolor de muelas, aplicándolo por medio de enjuagues. Esta planta es hipnótica, purgante y diurética. Se ha recomendado también como antifebril, astringente, drástica y sedante. (26)

Otros datos:

Los árboles se siembran a menudo como postes vivos en cercos. Las ramas estrujadas han servido como barbasco para matar peces. Aunque posee propiedades tóxicas o narcóticas, la corteza y otras partes del árbol han servido en remedios caseros. La corteza produce un tinte amarillo que se ha usado para teñir telas. (5) Gran parte de la población salvadoreña cree en la existencia de “espíritus malignos” los cuales pueden “invadir” o “entrar” en las casas. Igualmente también se cree que hay objetos y sustancias que los espantan siendo la semilla de *Erythrina berteroana* una de las especies utilizadas para elaborar collares y pulseras con las semillas secas teniendo cuidado ya que

éstas son venenosas. Se colocan en el cuello y en la muñeca de la mano izquierda. (26)

Tabla N° 1. Usos Medicinal de *Erythrina berteroana* (26, 28)

Parte Utilizada	Uso Medicinal	Remedio Casero
Flores frescas	Contra el insomnio.	Hacer infusión de unos pedacitos de flor en agua suficiente para una taza. Tomar tibio un té cada 4 horas. (28) Cocimiento de un puñito de flores sin los estambres. (26)
Flores y hojas tiernas	Sedante y calmante	Cocimiento o té de unas tres hojitas y un puñito de flores bien despenicadas. (26)
Hojas frescas tiernas	Sedante y calmante	Cocimiento de unas tres hojitas partidas.
Flores frescas	Para el dolor de muelas	Cocer pedazos de cáscara de pito y cáscara de matasano en agua suficiente para un vaso. Hacer enjuagues tibios 3 veces por día. (28)
Hojas frescas	Prurito	Macerar varias hojas limpias, y hacer cataplasmas, lavándose las manos después de la aplicación. (26)

3.2. Generalidades de los alcaloides

La diversidad estructural y la gama de actividades farmacológicas hacen de los alcaloides uno de los grupos de compuestos más importantes entre las sustancias naturales con interés terapéutico. ⁽⁵³⁾ Los alcaloides son sustancias orgánicas nitrogenadas con carácter básico y mayoritariamente de origen vegetal, dotados de actividades fisiológicas diversas así como de presentar toxicidad a determinadas dosis. ⁽³¹⁾

3.2.1. Historia

En 1803 Charles Louis Derosne obtuvo del opio un producto que llamó "sal de Derosne" o narcotina. Tres años más tarde, Friedrich W. A. Sertürner, farmacéutico alemán pionero del descubrimiento y aislamiento de los principios químicos de la morfina; comprobó la naturaleza alcalina del principio activo somnífero del opio, principio que llamó morfina, en 1817. ⁽³⁶⁾ Estas sustancias tenían la característica química de ser básicas, por lo que se les llamó alcaloides, la denominación procede de Carl W. Meissner, quién aisló la veratrina en 1818, y Ferdinand Runge la cafeína en 1820. ⁽¹⁾

Pierre Joseph Pelletier y Joseph Bienaimé Caventou, farmacéuticos franceses, aislaron una gran cantidad de principios activos pertenecientes a este grupo: la emetina en 1817, la estricnina en 1818, la brucina en 1819, la quinina en 1820 y también la colchicina. Así una larga lista de alcaloides entre los que figuran la narceína, la codeína, la cinchonina la nicotina y la atropina. ⁽³⁶⁾

A lo largo de la primera mitad del siglo XIX se dieron los primeros pasos de la farmacología experimental, aislando numerosos alcaloides e iniciando con el estudio de estos. François Magendie (1783-1855) fue el primero en estudiar la actividad farmacológica de algunos de estos compuestos nitrogenados en ensayos biológicos, centrandose principalmente sus trabajos en el alcaloide aislado de la nuez vómica (***Strychnos nux-vomica***), estrocinina. Este alcaloide es un estimulante neuronal muy tóxico y se utiliza todavía como raticida. Posteriormente Claude Bernard (1813-1878), continuó con los ensayos de la actividad farmacológica de otros alcaloides como la nicotina del tabaco y los alcaloides del opio. ⁽³⁶⁾

3.2.2. Estado natural y distribución.

En la actualidad se conocen más de 27,000 alcaloides ⁽¹⁹⁾, su distribución es abundante en Angiospermas, especialmente en ciertas Familias como Lauráceas, Magnoliáceas, Annonáceas, Menispermáceas, Apocináceas, Asteráceas, Papaveráceas, Rubiáceas, Ranunculáceas, y Solanáceas. ⁽³⁶⁾

Las especies que contienen alcaloides, rara vez contienen un sólo alcaloide, habitualmente contienen varios así como sustancias relacionadas. Hay alcaloides que son muy específicos y sólo se encuentran en individuos de una sola especie: por ejemplo, la cocaína en las hojas de coca o la quinina en la corteza de la quina; en cambio, hay alcaloides que son inespecíficos y se pueden encontrar en varias especies e incluso en varias familias: por ejemplo, la nicotina y la cafeína. Los alcaloides pueden estar presentes en el vegetal como bases libres, en forma de sal o unidos a taninos o ácidos orgánicos. ⁽⁵³⁾

Durante mucho tiempo, los alcaloides han sido considerados únicamente como productos del metabolismo vegetal, aunque se han encontrado en los animales como productos formados a partir de los vegetales ingeridos. ⁽⁵⁾ Pero en otros casos en especial de los venenos de algunos batracios y de algunos peces, se trata de verdaderos productos del metabolismo animal ⁽¹⁹⁾ y de organismos marinos.

3.2.3. Localización de los alcaloides

En el vegetal, los alcaloides se encuentran formando combinaciones solubles al estado de sales: citratos, maleatos, tartratos, isobutiratos y benzoatos. Se localizan de forma constante en tejidos periféricos: tegumentos de la semilla, capas externas de cortezas, tallos, raíces, epidermis, capas subepidérmicas de las hojas y en otras partes del vegetal dependiendo de la especie. ⁽¹⁹⁾ En una planta determinada, los mismos alcaloides no se encuentran obligatoriamente presentes en todos sus órganos, y una planta con alcaloides puede tener órganos que no los contengan. ⁽⁵⁾

3.2.4. Función de los alcaloides en el vegetal

En las plantas, estas sustancias pueden tener diferentes finalidades o funciones, entre las cuales están:

- Sirven como productos de desecho o almacenamiento del nitrógeno sobrante, esta función es equivalente a la del ácido úrico o de la urea en los animales. ⁽³⁶⁾

- En algunos casos los alcaloides pueden servir como productos de almacenamiento del nitrógeno no metabolizado o para transporte del mismo.
- La microquímica ha permitido mostrar en forma general, que los alcaloides son localizados en los tejidos periféricos de los diferentes órganos de la planta, es decir en el recubrimiento de las semillas, corteza del tallo, raíz o fruto y en la epidermis de la hoja; esto nos permite pensar que los alcaloides cumplen una importante función como es la de proteger a la planta, por su sabor amargo de estos, del ataque de insectos.
- Los alcaloides pueden servir de reguladores del crecimiento, se ha demostrado que los alcaloides derivados de la putrescina se incrementan notablemente en algunas plantas cuando se encuentran en suelos deficientes de potasio. ⁽³⁶⁾

3.2.5. Propiedades fisicoquímicas

Los alcaloides tienen masas moleculares que varían entre 100 y 900, son casi siempre incoloros a excepción de aquellos altamente conjugados como berberina (amarillo), sanguinarina (rojo), urabaina (verde) y oxoaporfinas que van de amarillo a rojo.

Son normalmente sólidos a temperatura ambiente, algunas bases no oxigenadas como laconiina, la nicotina y la esparteina que son líquidas; con algunas excepciones como la arecolina que es oxigenada y líquida; los alcaloides base son poco solubles en agua. ⁽³⁶⁾

En general estos compuestos cuando carecen de oxígeno son líquidos a temperatura ambiente y son frecuentemente volátiles, presentando un olor característico. Los alcaloides oxigenados suelen ser sólidos cristalizables, en su forma libre son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos polares y apolares. Todos los alcaloides que están en forma de sal son solubles en agua y mezclas hidroalcohólicas e insolubles en disolventes orgánicos apolares. (31)

La solubilidad depende del pH, en la forma protonada predomina a pH ácido, soluble en agua y mezclas hidroalcohólicas. A pH básico los alcaloides están mayoritariamente en forma libre. (36)

3.2.6. Estructura química

Los alcaloides son compuestos que contienen uno o varios átomos de nitrógeno en su estructura, son de bajo peso molecular y se encuentran principalmente en las plantas, en menor medida en microorganismos y animales. Más de 27,000 estructuras diferentes se han caracterizado siendo 21,000 de especies vegetales. El nitrógeno está presente en forma de amina primaria, secundaria o terciaria, el cual generalmente confiere la basicidad, lo que facilita el aislamiento y la purificación, ya que las sales solubles en agua se pueden formar en presencia de ácidos minerales. (19)

Sin embargo el grado de alcalinidad es muy variable, dependiendo de la estructura de la molécula del alcaloide y la localización de otros grupos funcionales, de hecho, algunos alcaloides con función amida son esencialmente neutros. En la naturaleza también se encuentran alcaloides conteniendo una amina cuaternaria, de esta función depende su actividad biológica. (19)

Los alcaloides son un grupo muy heterogéneo de compuestos con estructuras muy variadas y generalmente complejas. Todos contienen C, H y N, algunos tienen oxígeno y poco azufre. El nitrógeno que contienen puede formar parte de un ciclo, con N-heterocíclico o con N-no heterocíclico. Se suelen clasificar en función de su estructura, diferenciando por lo tanto los compuestos no heterocíclicos de los heterocíclicos, dentro de este último grupo se clasifican los alcaloides según su estructura química.

Se pueden emplear otras clasificaciones, agrupando los alcaloides según las propiedades farmacológicas que presentan, o bien teniendo en cuenta su distribución botánica. (36)

3.2.7. Clasificación

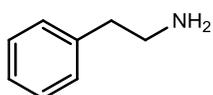
Además de clasificar los alcaloides según sus propiedades farmacológicas y estructura química, existe otra forma considerando el origen biogénico. Al utilizar esta clasificación se pone de manifiesto una homogeneidad bioquímica, aunque aparentemente existan diferencias bajo el punto de vista estructural, ya que todos los alcaloides pueden considerarse ligados a un número bastante limitado de aminoácidos precursores.

La clasificación biogénica abarca totalmente la clasificación estructural haciéndola indispensable para el razonamiento quimiotaxonómico, válido en el caso de todos los productos del metabolismo secundario de los vegetales, evidente de manera especial para los alcaloides. (19)

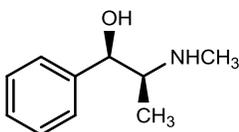
La clasificación de los alcaloides se puede hacer en base a su estructura y en base a su origen. Los alcaloides se agrupan en dos grupos: (Ver figura N° 5)

- Con nitrógeno no heterocíclico. (Ver Figura N° 4)
- Con nitrógeno heterocíclico (36)

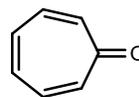
Con estructura de Feniletilamina



Ejemplo: Efedrina



Con anillo de Troponona



Ejemplo: Colchicina

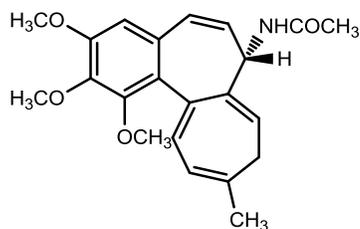


Figura N° 4. Alcaloides con nitrógeno no heterocíclico

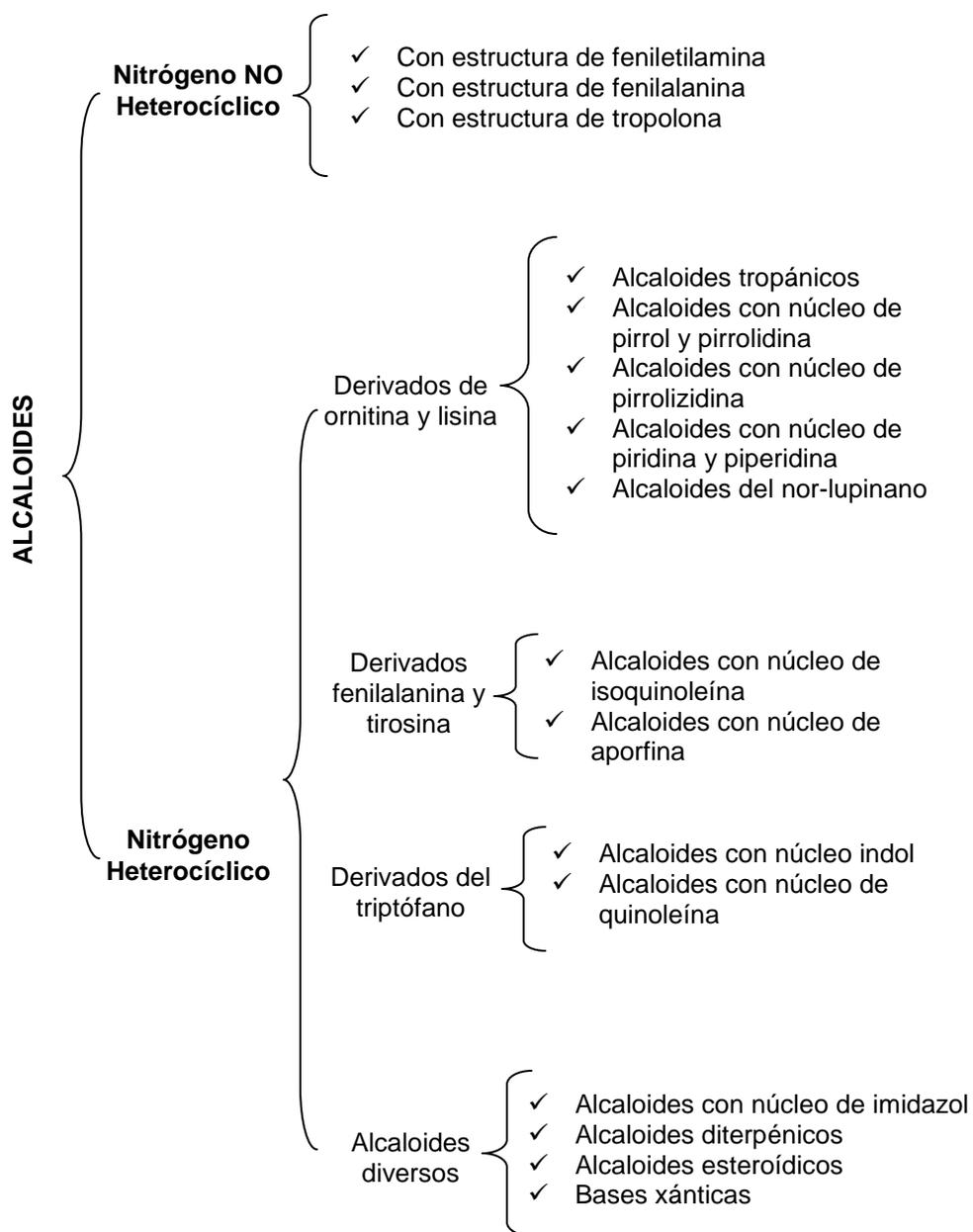


Figura N° 5. Clasificación de alcaloides en base a su estructura.

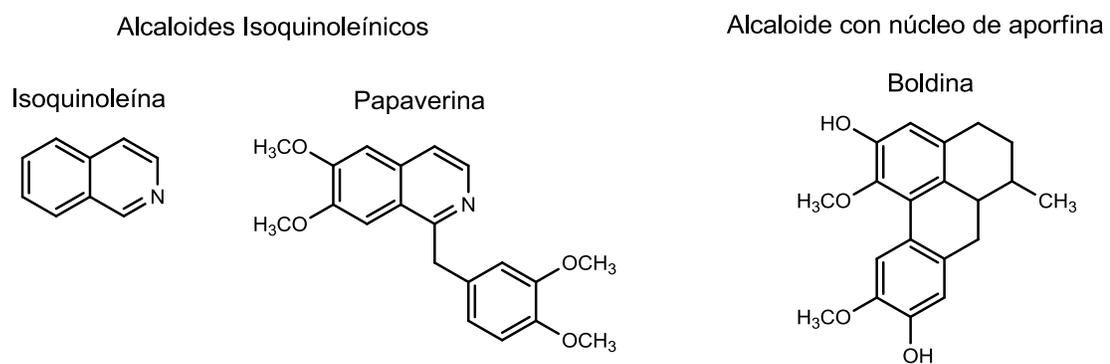


Figura N^o 6. Alcaloides derivados de la fenilalanina y tirosina

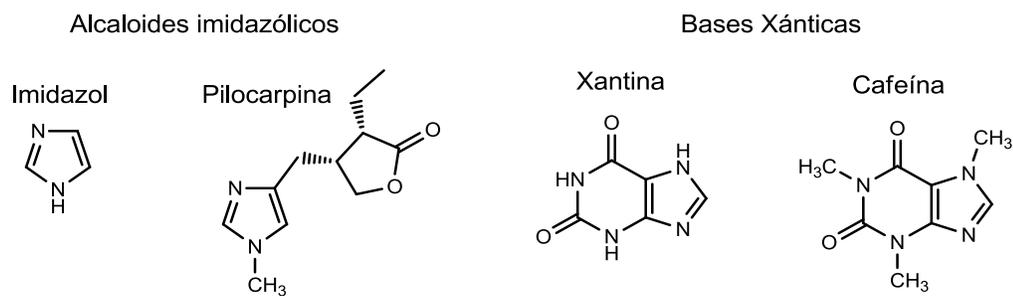


Figura N^o 7. Alcaloides Diversos

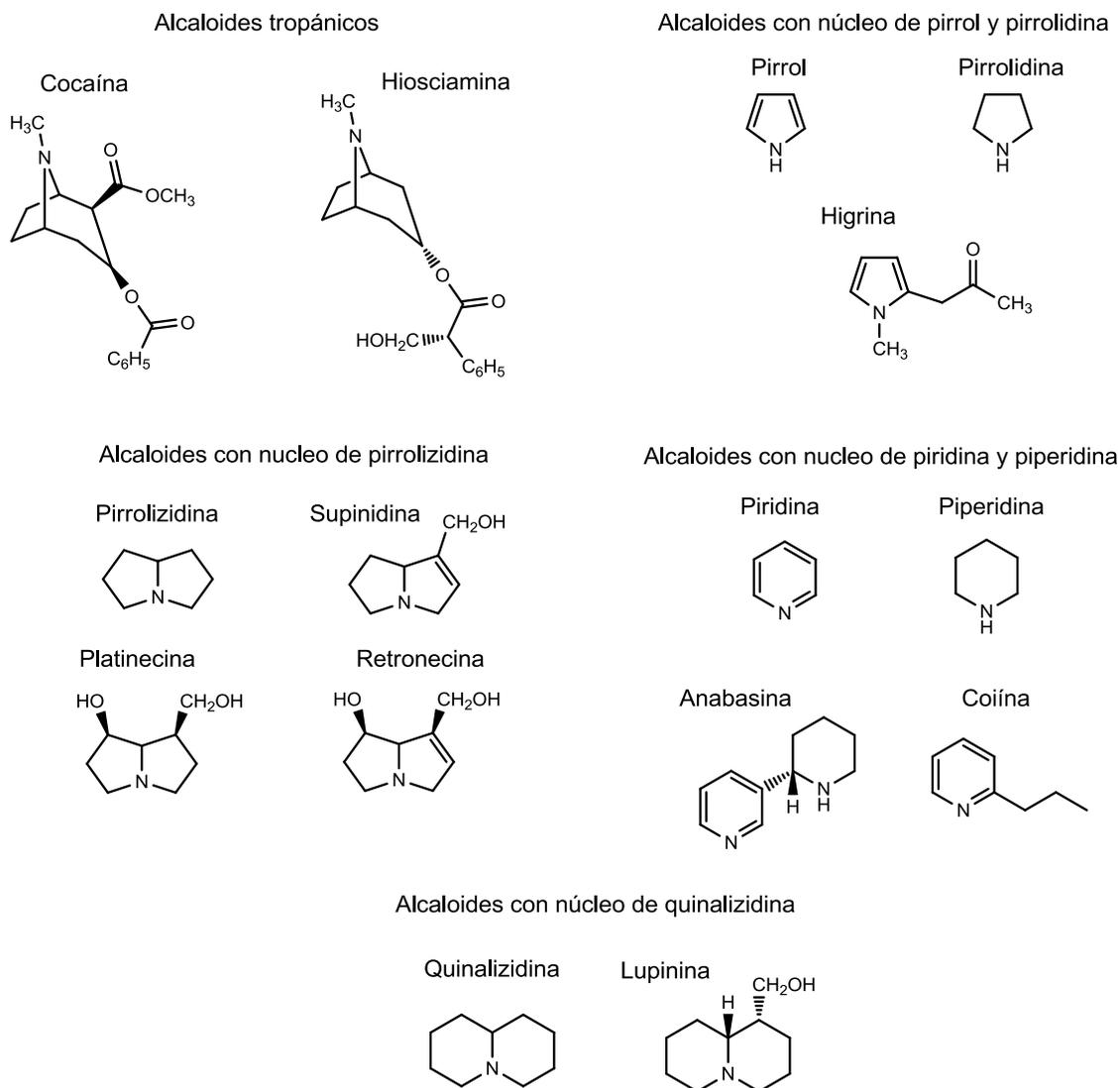


Figura. N° 8. Alcaloides derivados de la ornitina y lisina

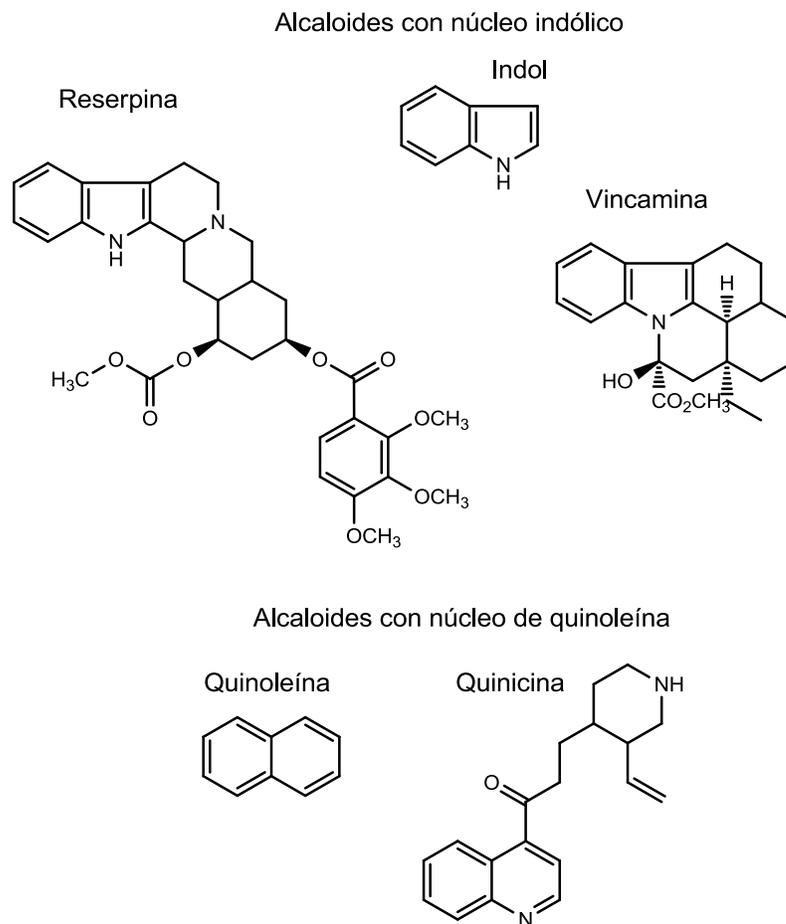


Figura N° 9. Alcaloides derivados del triptófano.

3.2.8. Nomenclatura

Todos los alcaloides se nombran con la terminación “-ina”, por lo que la nomenclatura es muy variada y puede hacer referencia a:

- La especie que los contiene, por ejemplo: Atropina, de *Atropa belladona* o Efedrina, de *Ephedra sp.*). (36)

- El efecto que producen, por ejemplo la Emetina de la ipecacuana (*Cephaelis ipecacuana*) es un emético.
- Al nombre común de la especie que los produce, por ejemplo la Ergotamina, de ergot o cornezuelo de centeno (*Claviceps purpurea*), cafeína, del café (*Coffea arabica*). (36)

3.2.9. Detección y extracción de los alcaloides

3.2.9.1. Ensayos para la detección de los alcaloides

Hay reactivos que detectan alcaloides en general y también hay reactivos que detectan grupos de alcaloides que tienen en común una estructura determinada, así como los reactivos específicos para un alcaloide en concreto.

Las reacciones para la detección de los alcaloides se pueden clasificar en reacciones de precipitación, cristalización y reacciones coloreadas. (36)

Reacciones de precipitación: basadas generalmente en la combinación de los alcaloides con metales pesados.

Se llevan a cabo en solución acuosa ácida, en cuanto a los reactivos más utilizados para la precipitación de los alcaloides son:

- **Ácidos de elevado peso molecular:** ácido fosfowolfrámico o fosfotungsténico, ácido silicowolfrámico y ácido fosfomolibdénico.
- **Reactivos yodados:** reactivo de Valser y Mayers, reactivo de Wagner, reactivo de Dragendorff, entre otros. (36)

Reacciones de cristalización: los reactivos más utilizados son: ácido pícrico, cloruro, bromuro áurico y cloruro de mercurio.

Reacciones coloreadas: se pueden distinguir entre reactivos generales y reactivos específicos.

Producen reacciones generales la deshidratación con ácido sulfúrico o la oxidación con ácido nítrico, permanganato de potasio o dicromato de potasio. Se producen reacciones específicas con:

- **Reactivo de Vitali–Morin:** ácido nítrico, acetona, NaOH y MeOH. Detecta alcaloides tropánicos y produce una coloración violeta.
- **Reactivo de Van Urk:** *para*-dimetilaminobenzaldehído. Detecta los alcaloides con el núcleo de ergolina como, por ejemplo, los alcaloides del cornezuelo de centeno, dando como evidencia positiva una coloración azul.
- **Reactivo de Oberlin-Zeisel:** cloruro férrico en ácido clorhídrico. Detecta tropolonas como la colchicina. ⁽³⁶⁾

3.2.9.2. Extracción de los alcaloides

Hay diferentes procedimientos para extraer los alcaloides, pero es conveniente realizar una serie de operaciones previas para favorecer su extracción. Estas operaciones son la pulverización y el desengrasado.

La pulverización de la droga consiste en disminuir su tamaño haciéndola pasar por un tamiz muy fino; al pulverizar la droga se rompen las vacuolas que contienen los alcaloides y se aumenta la superficie de contacto entre ella y el disolvente con el que se realizará la extracción. ⁽³⁶⁾

El desengrasado es una operación previa que solo se realiza en drogas que tienen elevados contenidos de grasas, ceras, etc. Consiste en eliminar estos compuestos con hexano o éter etílico. Una vez realizadas las operaciones previas necesarias se procede a la extracción. (36)

La extracción de los alcaloides se puede llevar a cabo con disolventes líquidos (en medio ácido o básico) o mediante destilación por arrastre de vapor de agua. En definitiva se pueden establecer cuatro métodos de extracción:

- 1. Extracción con disolvente orgánico apolar en medio básico:** Es un método muy utilizado y consiste en tratar la droga pulverizada con un disolvente orgánico apolar (éter, cloroformo, etc.) en medio básico. El medio básico utilizado depende de la basicidad de los alcaloides que se desea extraer y el medio básico libera los alcaloides, que pasan a la forma básica libre, soluble en el disolvente orgánico apolar. La transferencia de los alcaloides a la solución orgánica se puede realizar por tres métodos: maceración, percolación y soxhlet.

A continuación se trata la solución orgánica con agua en un medio ácido en exceso obteniéndose dos fases. El medio ácido protona los alcaloides formando sales y pasan a la forma acuosa. Dicha fase acuosa se vuelve a tratar con un disolvente orgánico apolar en medio básico, se vuelven a obtener las dos fases y los alcaloides pasan a la fase orgánica en forma libre. Por evaporación de esta última solución orgánica se obtiene un residuo que contiene los alcaloides.

- 2. Extracción con alcohol en medio ácido:** se coloca la droga pulverizada en alcohol o en una mezcla hidroalcohólica en medio ácido, se lleva a ebullición y se obtiene una solución alcohólica. (36)

Por evaporación del disolvente, se obtiene un residuo que contiene los alcaloides en forma de sal, y por tratamiento con éter y amoniaco, se obtienen los alcaloides en solución etérea y en forma básica (libre). ⁽³⁶⁾

- 3. Extracción con alcohol:** se coloca la droga pulverizada en etanol y se procede a la extracción por medio de reflujo o soxhlet. La selectividad del etanol es más relevante por su naturaleza polar, lo que permite la extracción de materiales hidrófilos e hidrófobos con lo que se facilita agotamientos de la droga vegetal en forma amplia. A continuación se pasa el extracto al medio ácido con el objetivo de purificar y obtener los alcaloides en forma de sal, lo que posteriormente se analizarán.

- 4. Extracción con agua en medio ácido:** consiste en llevar a ebullición la droga en agua y en un medio ácido para obtener una solución acuosa que contiene los alcaloides en forma de sal. A continuación se adicionan metales pesados que forman con los alcaloides estructuras complejas de las cuales se extraen los alcaloides. ⁽³⁶⁾

- 5. Extracción con agua destilada:** la droga pulverizada se pone a ebullición en agua destilada mediante el método de extracción reflujo, método adecuado para extraer sustancias hidrosolubles. Los alcaloides son extraídos en forma de sal.

- 6. Destilación por arrastre de vapor de agua:** es una técnica aplicable solamente a alcaloides volátiles que son los que no contienen oxígeno en su estructura. Consiste en realizar una destilación de la droga en agua que al evaporarse ésta arrastra los alcaloides. El vapor de agua se condensa y se recoge sobre una solución ácida para fijar los alcaloides que finalmente estarán en forma de sal. ⁽³⁶⁾

3.3. Alcaloides del Erythrinano

La investigación sobre **Erythrina** inició a finales del siglo XIX, específicamente durante las dos últimas décadas. Los extractos de **Erythrina** han presentado actividad bloqueadora neuromuscular, lo cual es a causa de los alcaloides presentes en la especie.

La elucidación de las diferentes estructuras de los alcaloides presentes en este género, ha sido posible mediante el uso de técnicas como la espectrometría de masas, espectroscopía de resonancia magnética nuclear, cromatografía de líquidos y de gases, y cristalografía de rayos X, auxiliándose de reacciones químicas específicas, encontrando que los alcaloides que son característicos de **Erythrina** son de tipo **isoquinolínico**, caracterizados por su única estructura espiroamina tetracíclica, que es un esqueleto *Erythrinano* (Ver Figura N° 10). Se clasifican de acuerdo a su estructura en 3 grupos: diénicos, alquénicos y lactónicos. (31)

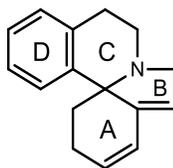


Figura N° 10. Esqueleto del Erythrinano

Los alcaloides diénicos contienen un sistema dieno conjugado en los anillos A y B. (Ver Figura N° 11) (31)

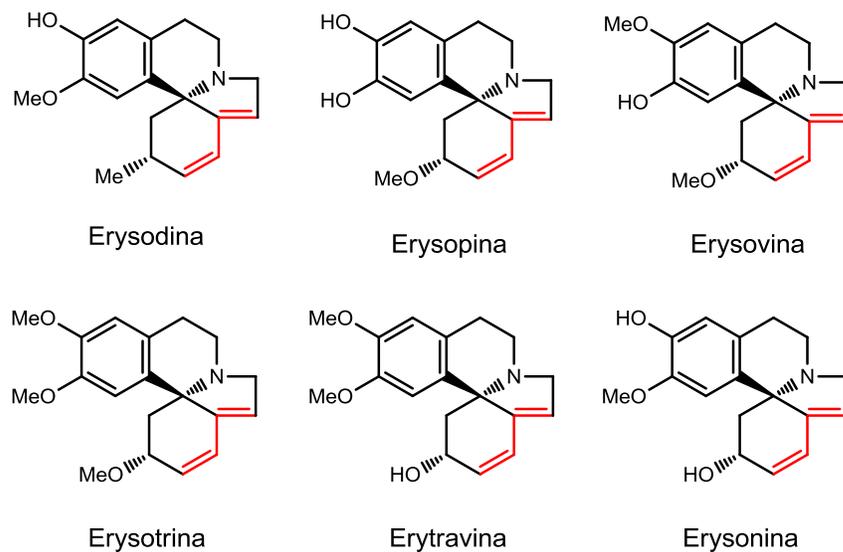


Figura N° 11. Estructura de los alcaloides diénicos

Los alcaloides alquénicos tienen una insaturación 1, 2 en el anillo A. (Ver Figura N° 12) (31)

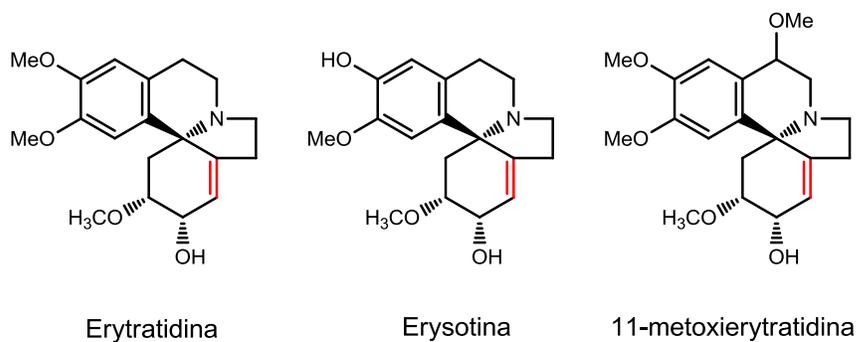


Figura N° 12. Estructura de los alcaloides alquénicos

Los alcaloides lactónicos tienen, como su nombre lo indica, una lactona en lugar del anillo aromático (Ver Figura N° 13) ⁽³¹⁾

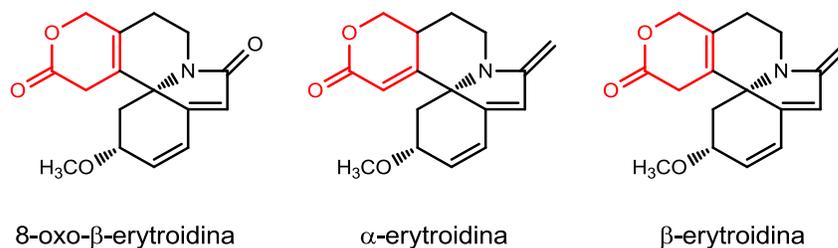


Figura N° 13. Estructura de los alcaloides lactónicos

Las técnicas más empleadas para el análisis de los extractos de alcaloides del género *Erythrina*, son la cromatografía de gases (CG)/espectrometría de masas (EM), con la cual se han identificado este tipo de alcaloides, además de la separación de isómeros como erysodina y erysovina; y CLAR (cromatografía de líquidos de alta resolución)/EM con la que ha sido posible detectar alcaloides que no es posible identificarlos por CG/EM. *Carmack y col.* (1951) determinaron por primera vez que el esqueleto de los alcaloides de *Erythrina* estaba formado por una espiroamina tetracíclica.

Más tarde se determinó la presencia de dos tipos de alcaloides, los cuales se diferenciaban en el anillo D, unos con una lactona y otros con un anillo bencénico. Siete años después se confirmó la estructura de los alcaloides aromáticos de *Erythrina*, lo cual se determinó una vez que se había establecido la posición del radical metóxilo (-OCH₃) sustituyente del carbono 3 (C-3) y su configuración *cis* con respecto al átomo de N en la molécula de hidrobromuro de erytralina, gracias a la técnica analítica de difracción de Rayos X. ⁽³¹⁾

Tal hallazgo fue de suma importancia, ya que se tomó la erytralina como modelo para elucidar la estructura de los demás alcaloides (Nowacki y Bonsma, 1958). (31)

J. R. Hanson (1963), reveló la configuración $3R$ y $5S$ de la α y β -erytroidina. (Ver Figura N° 14). A partir de este hallazgo se comenzó a determinar la estructura del resto de los alcaloides haciendo comparaciones de sus constantes espectroscópicas y estereoquímicas mediante la técnica de dispersión de rayos X con estudios previos. *Soto* (1989) reporta que la conformación de los alcaloides de *Erythrina* es la requerida para establecer una interacción entre los alcaloides de tipo antagonista nicotínico y el receptor nicotina-acetilcolina; tal conclusión se deriva de la estereoquímica de los alcaloides, determinada por el análisis por Cristalografía de Rayos X. Las técnicas analíticas posibilitan elucidar nuevas estructuras y de esta manera correlacionar la actividad biológica de tales compuestos. (31)

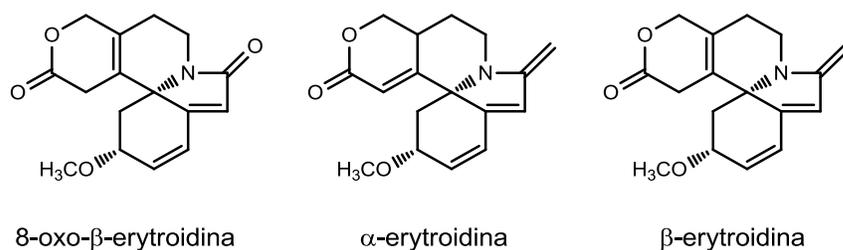


Figura. N° 14. Alcaloides elucidados en 1963 por J. R. Hanson.

3.3.1. Biosíntesis

Barton y Cohen (1957) propusieron la primera ruta biosintética para los alcaloides de *Erythrina*. En la biosíntesis ocurre un acoplamiento fenólico-oxidativo del precursor (*S*)-*N*-nor-protosinomenina conducente a la apertura del anillo, seguido de la reducción de la imina generada, produciéndose de esta manera el intermediario dibenzanonina. Posteriormente, se oxida la dibenzazonina a difenoquinona, seguido de un ataque intramolecular del nitrógeno que da lugar a la formación de erysodienona.

Finalmente, la reducción del doble enlace y del radical cetona da origen a un compuesto alquénico, el cual por eliminación 1,4 de una molécula de agua produce un alcaloide tipo diénico. Por otro lado se ha demostrado que únicamente la erysodienona que contiene el centro quiral (5*S*) de los alcaloides naturales, es un precursor de la erytralina y de la α y β -Erytroidina. (Ver Figura N° 15).

La ruta biosintética que da lugar a la formación de los alcaloides diénicos: erysodina, erysovina, erysopina, entre otros, así como, erytratina y erytralina tienen como precursor a la erysotina, que es un alcaloide alquénico (Ver Figura N° 16). Otros han determinado que los alcaloides aromáticos de *Erythrina* son los precursores de los alcaloides lactónicos. (Ver Figura N° 17) ⁽³¹⁾

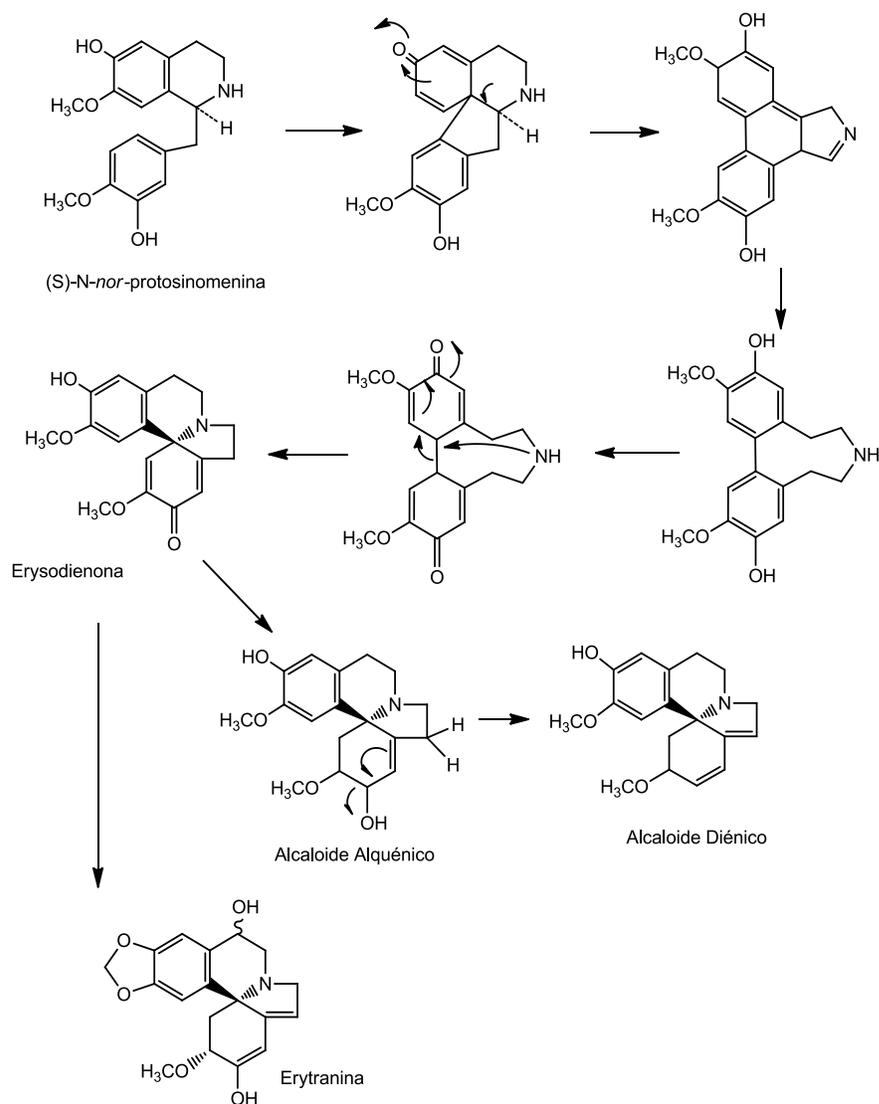


Figura. Nº 15. Ruta de Biosíntesis de los alcaloides del género *Erythrina*.

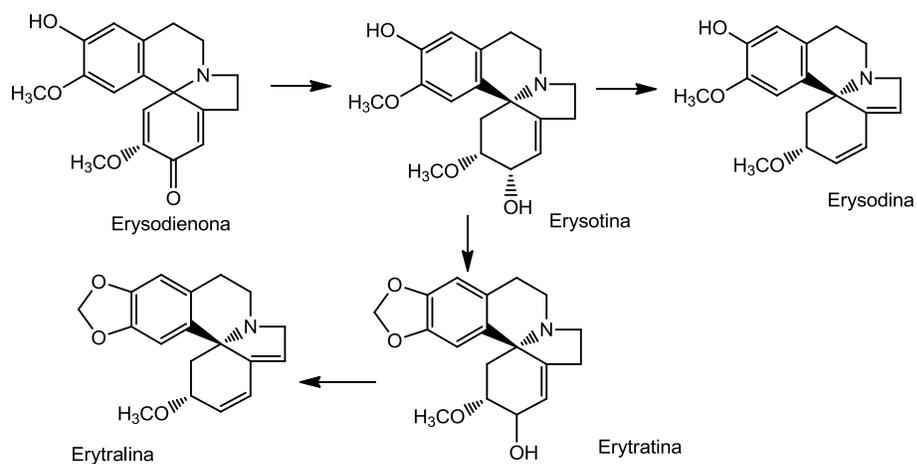


Figura. N° 16. Ruta de biosíntesis de los alcaloides diénicos.

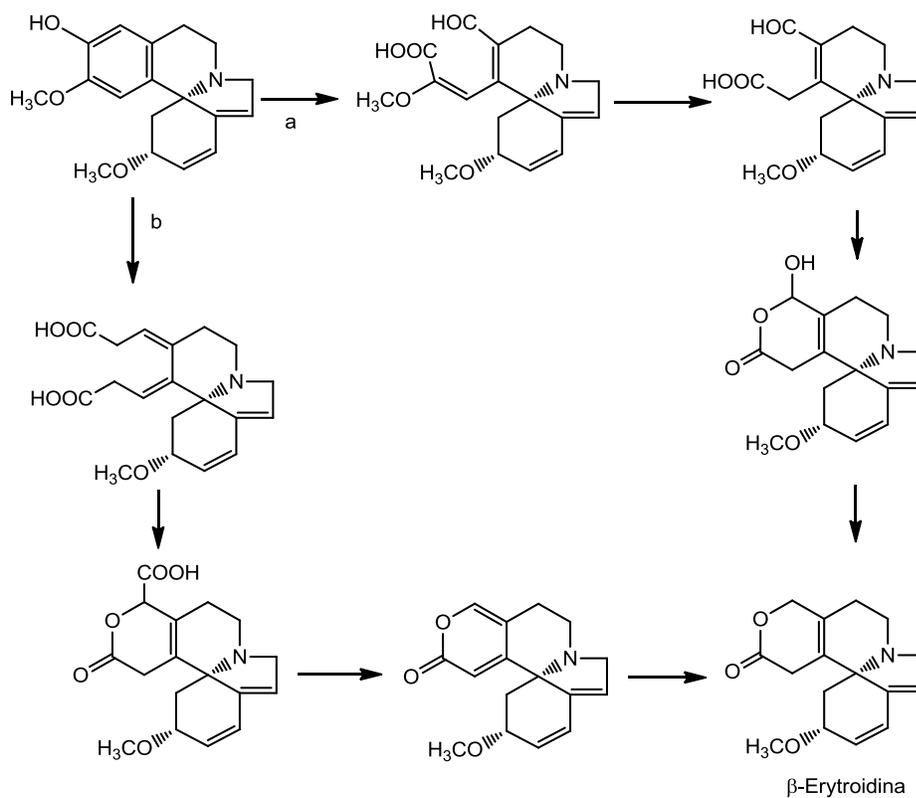


Figura. N° 17. Ruta de biosíntesis de los alcaloides lactónicos.

3.3.2. Alcaloides del género *Erythrina*

Varias especies de *Erythrina* son de uso común en la medicina tradicional, a pesar de eso existen muy pocos estudios farmacológicos que respalden la utilización de estas plantas de manera adecuada. La mayoría de estas especies contienen diversos efectos biológicos que las caracterizan como lo son los efectos sobre el sistema nervioso central, actividades anticonvulsivantes, sedantes, hipnóticas y ansiolíticas han sido determinadas mediante ensayos biológicos en *Erythrina velutina*, *Erythrina mulungu*, *Erythrina speciosa*, *Erythrina americana* y en *Erythrina berteroana*.⁽⁵³⁾

El estudio de los alcaloides presentes en este género data desde 1940, cuando Karl Folkers y Frank Koniuszy aislaron la erysoquina de las semillas de *Erythrina berteroana*, siendo los primeros en describir los alcaloides presentes en esta especie. Reportes afirman la presencia de alcaloides del tipo erythrinano en 70 especies de *Erythrina*, como lo son la 8-oxo- α -erythroidina y 8-oxo- β -erythroidina⁽¹¹⁾, alcaloides también aislados por A.S. Chawla de las semillas y hojas de *Erythrina berteroana* en 1982.

V. Boekelheide y colaboradores realizaron la caracterización de 2 alcaloides, α y β -erythroidina, estudios realizados pocos años después de los reportados por K. Folkers y F. Koniuszy en 1940. K. L. Rinehart estudió la composición de los alcaloides en las semillas de *Erythrina berteroana*, mediante cromatografía de gases reportó igualmente los alcaloides aislados por V. Boekelheide, y también la erysodina, erysoquina, y en menor proporción la erysopina, erysolina y erysonina, pero la espectroscopía de masas detectó 11-hidroxiderivados de erysoquina y erythratidina.⁽¹²⁾ (Ver Figura N° 18)

Más recientemente los alcaloides del erythrinano han sido ampliamente aislados de diferentes especies del género *Erythrina*, obteniendo a partir de estos, importantes actividades farmacológicas. A.S. Chawla y A.H. Jackson, iniciaron desde 1980, un exhaustivo estudio de este tipo de alcaloides procedentes de varias especies vegetales de distintos géneros y familias, realizando su aislamiento y determinación mediante procedimientos específicos.

A continuación se presentan especies que contienen alcaloides del tipo erythrinano, aislados por A.S. Chawla y A.H. Jackson en la década de los 80, que pertenecen a un género diferente al género *Erythrina*: ⁽¹²⁾

- | | |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| - <i>Dysoxylum lenticellare</i> | - <i>Hyperbaena columbica</i> |
| - <i>Cephalotaxus fortunei</i> | - <i>Phelline sp.</i> |
| - <i>Cephalotaxus sinensis</i> | - <i>Phelline lucida</i> |
| - <i>Cephalotaxus hainanensis</i> | - <i>Papaver bracteatum</i> |
| - <i>Cocculus laurifolius</i> | - <i>Corydalis claviculata</i> |

Algunas de las especies estudiadas por A.S. Chawla y A.H. Jackson del género *Erythrina* son: ⁽¹²⁾

- | | |
|---------------------------------|-------------------------------|
| - <i>Erythrina melanacantha</i> | - <i>Erythrina berteroana</i> |
| - <i>Erythrina variegata</i> | - <i>Erythrina merilliana</i> |
| - <i>Erythrina crista-galli</i> | - <i>Erythrina lysistemon</i> |

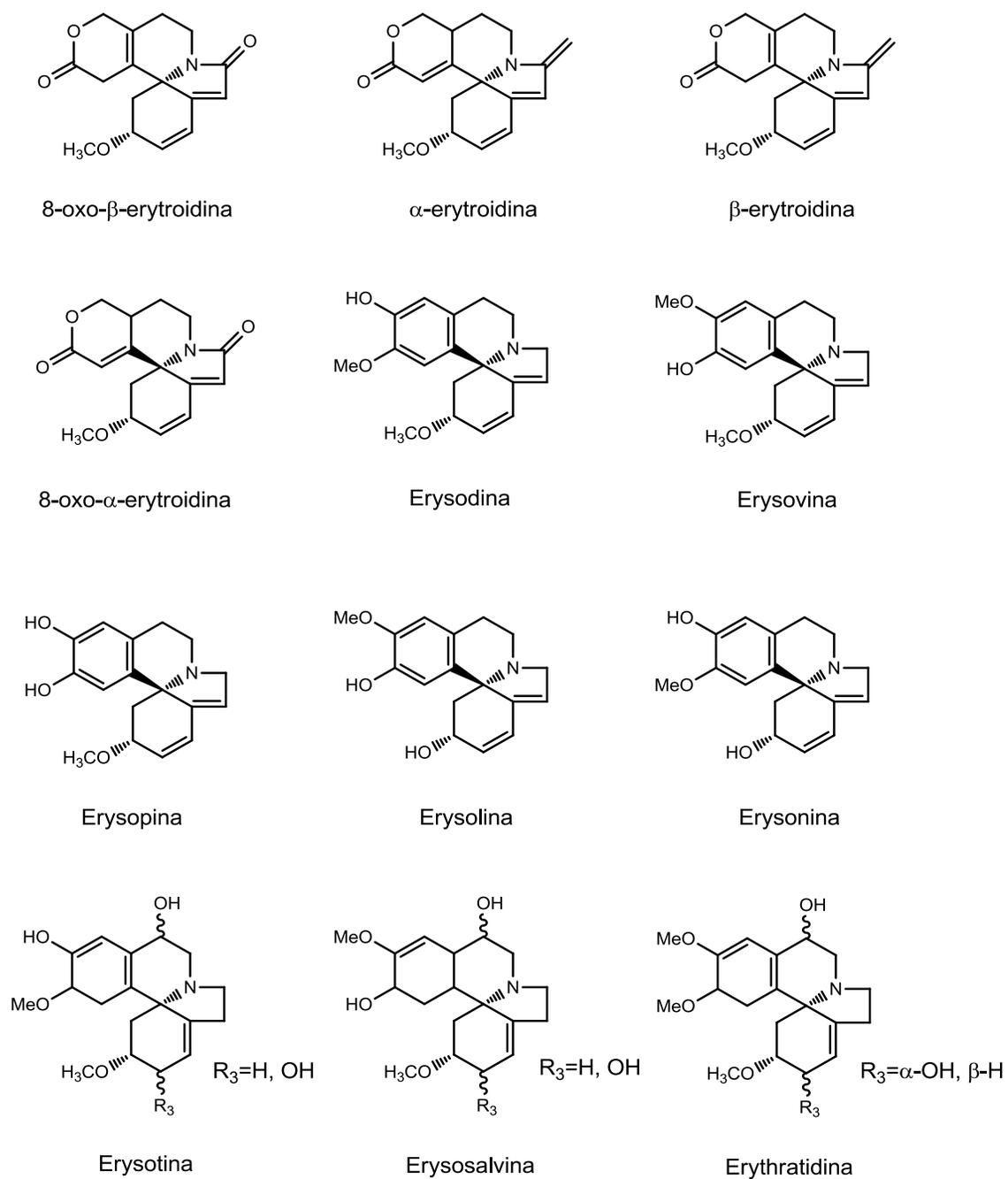


Figura. N° 18. Alcaloides presentes en *Erythrina berteroana*

Los alcaloides que se encuentran en mayor proporción y por lo tanto que caracteriza a este género son: (Ver Figura N°18) ⁽¹¹⁾

- α -erytroidina
- β - erytroidina
- 8-oxo- α -erytroidina
- 8-oxo- β -erytroidina

Estos alcaloides tienen una variedad de propiedades farmacológicas entre las cuales destacan: propiedad sedante, relajante muscular, ansiolítica, bloqueante neuromuscular y también en ciertos casos con propiedades anticonceptivas. ⁽⁵³⁾

Los estudios hechos por A.S. Chawla y A.H. Jackson entre los años 1983 y 1985 demuestran la presencia de erymelanthina en dos especies vegetales, ***Erythrina melanacantha*** y ***Erythrina merilliana***. El espectro de masas de este alcaloide indica la presencia de un dieno y de un segundo átomo de nitrógeno, su posición fue deducida mediante efectos NOE y RMN. También se aisló un análogo desmetoxicarboxilado de erymelanthina, siendo elucidada mediante cromatografía de gases y espectroscopía de masas, presente también en semillas de ***Erythrina variegata*** por lo que se afirma que la erymelanthina puede estar en varias especies de este género. (Ver Figura N° 19) ⁽¹⁵⁾

La elucidación de estructuras con un nitrógeno adicional motiva la investigación de otras especies que contengan este tipo de alcaloides, es así como la erythroculina, protostephanina y un nuevo alcaloide 3-dimetoxi-2 α , 3 α -metilendioxierythroculina, se aislaron de *Hyperbaena columbica* (Menispermaceae), al mismo tiempo que el estudio de las especies de *Erythrina*. De las flores de *Erythrina brucei* se aisló 8-oxoerythrinina, además de varios alcaloides ya conocidos, su estructura se deduce comparando datos espectroscópicos y con transformaciones químicas observadas en los espectros RMN. (Ver Figura N° 21) (13)

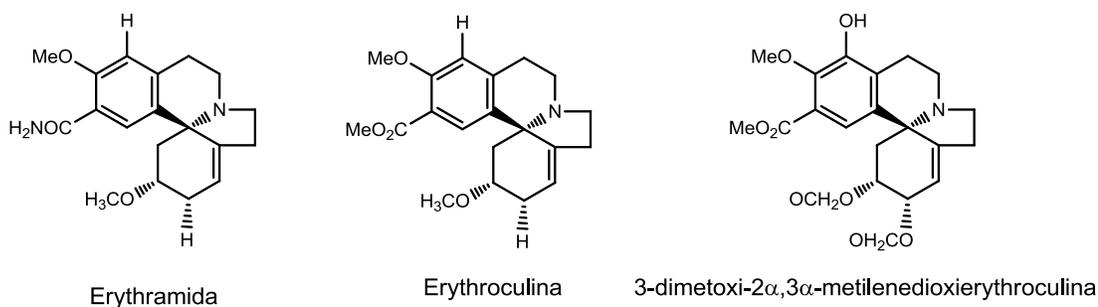


Figura. N° 21. Alcaloides presentes en *Hyperbaena columbica*

El alcaloide principal en las hojas de *Erythrina brucei* se ha identificado como 8-oxoerythrinina, compuesto también encontrado en las semillas de *Erythrina chiriquensis*, *Erythrina lysistemon*, *Erythrina abyssinica* y *Erythrina tahitensis*, su estructura fue determinada por ¹H y ¹³C RMN, espectrometría de masas y espectroscopía de gases. (Ver Figura N° 22) (13)

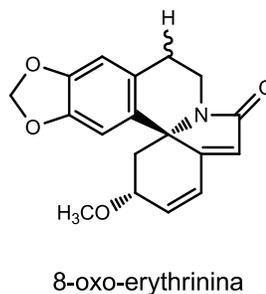


Figura N° 22. Alcaloide presente en varias especies del género *Erythrina*.

Otro 8-oxo alcaloide, fue encontrado durante la investigación de *Erythrina lysistemon*, 8-oxo- 11 β -metoxierythralina. Durante el mismo estudio y mediante espectrometría de masas se determinaron las estructuras de 11 β -metoxyerysodina y 11 α y 11 β -hidroxierysodina, los dos últimos fueron aislados por primera vez durante esta investigación. Realizando una O-metilación sobre 11 β -metoxyerysodina, se obtiene erythristemina, alcaloide ya encontrado anteriormente en este género. (Ver Figura N° 23) (13)

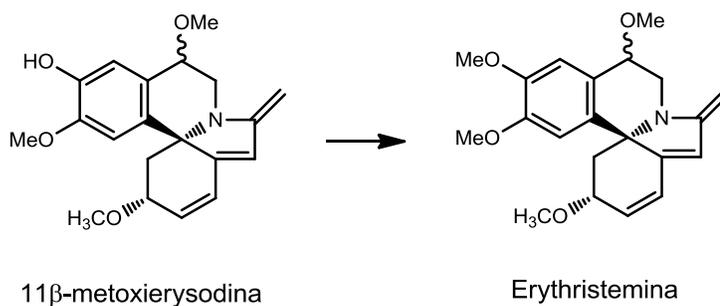


Figura N° 23. O-metilación de 11 β -metoxierysodina

En 1987, de las semillas de 4 especies de *Erythrina*, *E. brucei*, *E. cochleata*, *E. tholloniana* y *E. caribaea*, por cromatografía de gases y espectrometría de masas se elucidaron tres alcaloides: erysodina, erysopina y erysovina, en comparación con los estudios anteriores de *E. brucei* que además de los alcaloides anteriores se encontraron la erysotrina, erythratidina y 11-metoxierythratidina identificados también en *E. cochleata* la cual es la única especie de las 4 en contener erythravina. Los compuestos mayoritarios de *E. tholloniana* son α y β -erythroidina, también la erysotina. Durante la investigación de *E. caribaea* se aisló un nuevo alcaloide, erythrocarina, que fue caracterizado como un análogo metilendioxi de los alcaloides diénicos erysolina y erysonina. (Ver Figura N° 24) (15)

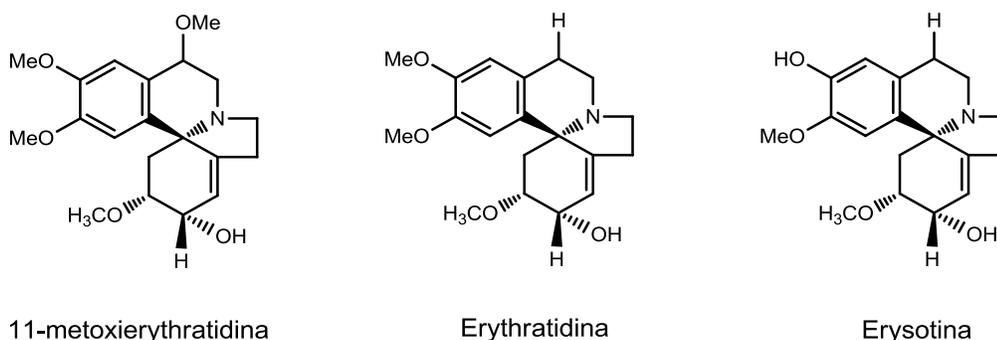


Figura N° 24. Alcaloides de *E. cochleata* y *E. brucei*

Las partes de la planta que son objeto de investigación son las hojas, las flores y las semillas ya que se considera que ahí se encuentran en cantidades considerables los alcaloides del tipo Erythrinano. Con relación a la fitoquímica, se han investigado más de 83 especies, siendo el género *Erythrina* el que constituye una fuente importante de especies usadas por la medicina tradicional de diversas regiones del mundo para el tratamiento de diversas patologías. (31)

3.4. Generalidades de métodos de extracción, fraccionamiento y separación de productos naturales.

Para la obtención de principios activos a partir de la droga existen varios métodos, entre los cuales tenemos:

1. Métodos extractivos a partir de la droga.
2. Métodos hemisintéticos o semisintéticos.
3. Métodos biotecnológicos.

El estudio de los productos naturales inician con la selección del material vegetal a estudiar, para ello se toman varios criterios, entre ellos:

- Por sus usos tradicionales.
- Composición química.
- Búsqueda de una actividad biológica concreta.
- Estudios de especies vegetales venenosas.
- Basada en la combinación de criterios.
- Selección arbitraria. ⁽³⁷⁾

Con el fin de mejorar el rendimiento de la extracción y la reproducibilidad de la misma hay que someter el material vegetal en estudio a una serie de operaciones preliminares, como son:

- a) Identificación botánica del material vegetal: género, especie, origen, etc.
- b) Selección de la parte vegetal a extraer: hojas, raíces, flores, semillas, etc.
- c) Inactivación de los sistemas enzimáticos del vegetal cuando se trabaja con materiales frescos (hojas y flores), es decir recién recolectados. ⁽³⁷⁾

Así se asegura su integridad evitando procesos de degradación que conlleve a la alteración de los principios activos.

- d) Deseccación de las plantas bajo condiciones controladas para evitar la transformación química de los componentes. El proceso debe de ser rápido, con temperatura moderada y preferiblemente con aire caliente. (4, 37)

3.4.1. Métodos extractivos a partir de la droga.

Se parte la droga y se realiza un proceso extractivo para aislar los principios activos. Existen varios métodos, los cuales son:

- Extracción mecánica: es una técnica que permite obtener los principios activos disueltos en los fluidos propios de la planta, los cuales una vez extraídos se denominan jugos.
- Destilación: es una técnica que se basa en la volatilidad de los componentes de la droga, lo cual permite la separación de componentes volátiles de otros que no son volátiles.

Se suelen hacer destilaciones por arrastre de vapor o hidrodestilaciones que facilitan la extracción de principios activos volátiles. Es un método en el que se utiliza una fuente de calor, por lo que sólo es aplicable a principios activos termoestables. (Ver Figura N° 25) (37)

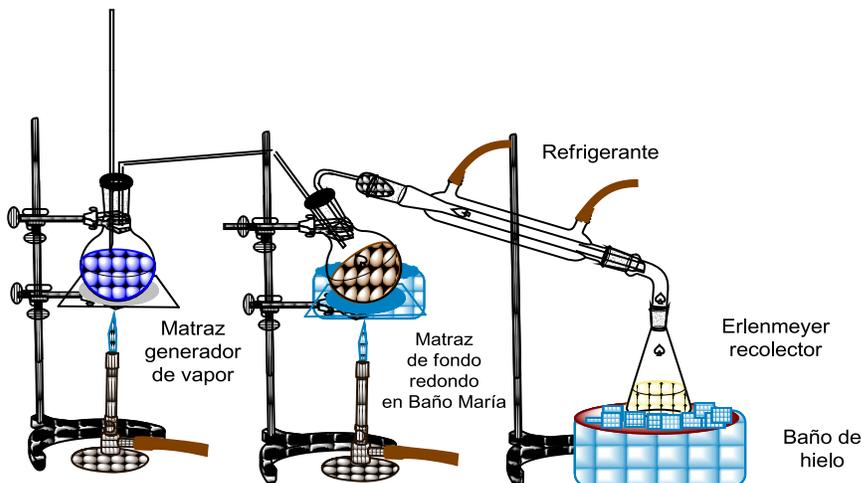


Figura N° 25. Aparato de destilación de arrastre por vapor.

- Extracción con disolvente: consiste en colocar la droga con un disolvente capaz de extraer los metabolitos secundarios. Los cuales deben de pasar de la droga al disolvente de manera que se obtengan un extracto líquido, que posteriormente se pueden concentrar eliminando la mayor o menor cantidad de disolvente. (37)

Para que la extracción con disolventes se lleve a cabo correctamente hay que tener en cuenta diversos factores:

- a. Características de la droga: estas deben estar con un grado de división adecuado para facilitar el máximo contacto entre los principios activos y el disolvente.
- b. Naturaleza del disolvente: principalmente se utilizan extracciones en mezclas hidroalcohólicas (agua y etanol, considerados como solventes universales) (37)

Se puede utilizar otros solventes orgánicos como: *n*-hexano, éter etílico, éter de petróleo, metanol, propilenglicol, etc. El agua es un buen disolvente de muchos principios activos de las drogas, pero algunos de estos se hidrolizan en agua. Por otra parte los extractos acuosos tienen un estabilidad poco duradera una vez preparados y deben ser obtenidos para su utilización en un período de tiempo corto.

- a. Temperatura. El aumento de la temperatura favorece la extracción de los principios activos porque aumenta su solubilidad en los disolventes pero a su vez puede favorecer la degradación de dichos principios activos por lo que es necesario controlarla para conseguir una máxima extracción sin consecuencias indeseables para los principios activos. En ningún caso se pueden utilizar temperaturas elevadas para extraer principios activos termolábiles.
- b. Tiempo de contacto entre la droga y el disolvente. Depende de las características de la droga (dureza, grado de división, etc.) y de la naturaleza de los principios activos (volátiles, hidrolizables, oxidables, etc.).
- c. Control de difusión celular. Una correcta difusión se consigue cuando la droga ofrece un grado de división adecuado (mayor superficie de difusión) y cuando se renueva correctamente el disolvente, se produce una difusión de los principios activos de la droga hacia el disolvente manteniéndose una diferencia de concentración de principios activos entre la droga y el disolvente, lo cual permite que se produzca la difusión celular pasiva. (37)

3.4.1.1. Extracción discontinua

La droga se pone en contacto con el disolvente por lo que la difusión de los principios activos se producirá en todas direcciones hasta alcanzar el equilibrio. La extracción discontinua incluye varios procedimientos de extracción:

- Maceración: se utiliza cuando los principios activos son muy solubles y la estructura de la droga es muy permeable al disolvente, útil para la extracción de principios activos termolábiles ya que se trabaja a temperatura ambiente dejando el material vegetal seco y triturado en contacto con el disolvente a temperatura ambiente.

Una desventaja de este método es que el proceso es lento, no se consigue agotamiento total de la muestra y se emplean grandes volúmenes de disolvente. (37,57) (Ver Figura N° 26)



Figura N° 26. Proceso de maceración

- Reflujo: es un método de extracción, donde la sustancia se coloca en un balón y se trabaja a temperaturas de ebullición. La muestra entra en contacto directo con la fuente de calor. (37) (Ver Figura N° 27).



Figura N° 27. Aparato de reflujo

- Infusión: se trabaja con un disolvente (agua) a temperatura próxima a la ebullición, en el que se introduce la droga que se quiere extraer y a continuación se deja enfriar el conjunto hasta temperatura ambiente.
- Decocción: la droga se pone en contacto con el disolvente (agua) y el conjunto se lleva hasta la temperatura de ebullición, manteniendo dicha ebullición durante unos 10-30 minutos. Una vez enfriado, se filtra y exprime el residuo. Se aplica generalmente a drogas duras (corteza, raíces, semillas, etc.) en las que resulta difícil el contacto entre los principios activos y el disolvente debido a sus características histológicas. (37)

Tanto en las infusiones como en las decocciones se utiliza como disolventes siempre el agua por lo que no resultaran métodos adecuados para extraer metabolitos secundarios activos hidrolizables. También hay que tomar en cuenta la poca estabilidad en el tiempo de los extractos acuosos, de ahí la conveniencia de preparar las infusiones y las decocciones en el momento en que se van a utilizar. (37)

3.4.1.2. Extracción continua

En este tipo de extracción el disolvente utilizado se va renovando y actúa en una sola dirección. La droga se pone en contacto con el disolvente adecuado y en todo momento se mantiene el desequilibrio entre la concentración de principio activo en la droga y en el disolvente, para que se produzca una difusión celular.

Entre los métodos de extracción continua destacan:

- Percolación: es un proceso que se realiza a temperatura ambiente. El disolvente fluye lentamente en contacto con el material vegetal, el cual es recogido por la parte inferior del percolador. Se puede llegar a la extracción completa de los principios activos con el inconveniente de un elevado consumo disolvente. (Ver Figura N° 28) ⁽³⁷⁾

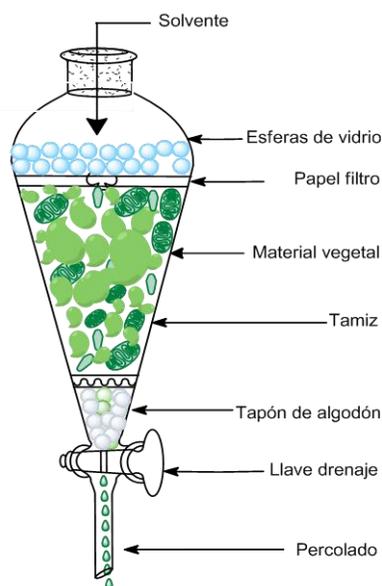


Figura N° 28. Aparato de percolación

- Soxhlet: es un sistema de extracción sólido-líquido en el que la extracción se realiza en un aparato que consta de un matraz o balón,

cuerpo extractor y refrigerante. Algunas ventajas de este método se mencionan: utilización volúmenes de disolventes menores, extracciones exhaustivas y tiempos más cortos de extracción. Al utilizar este tipo de extracción se debe tomar en cuenta el uso de disolventes de bajo punto de ebullición. ⁽³⁷⁾ (Ver Figura N° 29)



Figura N° 29. Aparato Soxhlet

3.4.2. Métodos de separación de metabolitos secundarios de la droga

La separación de los principios activos se puede llevar a cabo por métodos fisicoquímicos no cromatográficos o por métodos cromatográficos. (37)

3.4.2.1. Métodos cromatográficos

Consisten en la separación de los componentes de una mezcla debido a la diferente velocidad de elución a través de una fase estacionaria cuando la mezcla es transportada por una fase móvil.

La cromatografía es una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla, debido a la influencia de dos efectos contrapuestos:

- a) Retención: efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido.
- b) Desplazamiento: efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser un líquido o un gas.

La mezcla a separar se deposita sobre la fase estacionaria y la móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la mezcla a distintas velocidades, dependiendo de la magnitud de sus interacciones relativas con ambas fases. La repetición sucesiva de las operaciones elementales de retención y desplazamiento a lo largo del sistema cromatográfico da lugar a la separación de la mezcla original. (37)

La cromatografía se emplea para conocer y separar los componentes por diferencia de polaridad de una mezcla y su identificación.

3.4.2.1.1. Cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un absorbente mantenido sobre una placa, la cual puede ser de vidrio, aluminio u otro soporte. Los requisitos son un adsorbente, placas, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas.

La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares. La mezcla a analizar se deposita a una pequeña distancia del borde inferior de la placa y se introduce en una cubeta que contiene la fase móvil (eluyente), la cual asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando a los componentes de la mezcla a diferentes velocidades, lo que provoca su separación. ⁽³⁷⁾

Cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo superior de la placa, esta se saca de la cubeta, se deja secar y se procede a la visualización de las manchas. ⁽³⁷⁾ (Ver Figura N° 30)

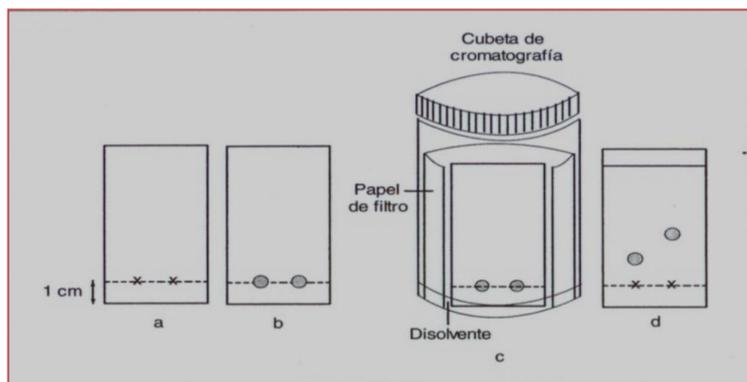


Figura N° 30. Realización de una cromatografía en capa fina

La placa se coloca en una lámpara de luz UV, con el objetivo de determinar los grupos cromóforos presentes en las manchas. Se procede luego utilizar un agente revelador. (32) (Ver Figura N° 31)

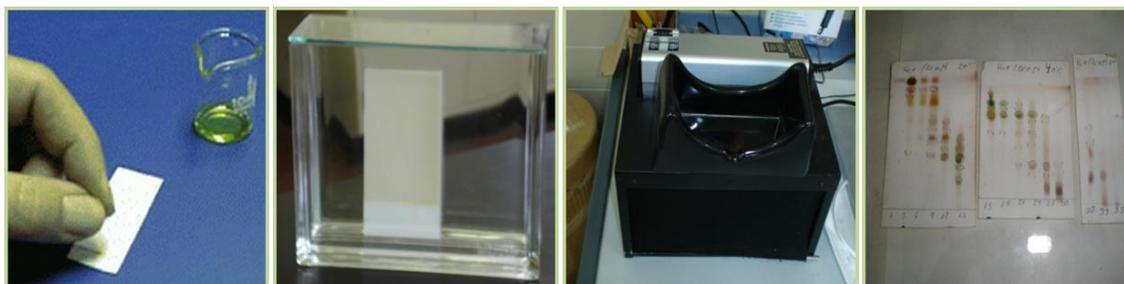


Figura N° 31. Procedimiento de la realización de la cromatografía en capa fina.

3.5. Generalidades del insomnio

El sueño es un estado fisiológico del que aún se desconocen con exactitud cuáles son sus funciones, aunque sus alteraciones se ven reflejadas en la vigilia del ser humano. ⁽³³⁾ Una de las alteraciones más frecuentes del sueño es el insomnio, el cual debe ser considerado como un síntoma y partiendo de esto, ubicarlo dentro de las distintas condiciones que pueden estar presentes, pues de ello dependerá el tratamiento correcto.

El insomnio es un trastorno del sueño consistente en la imposibilidad para iniciar o mantener el sueño, o de conseguir una duración y calidad de sueño adecuada para restaurar la energía y el estado de vigilia normal. El problema del insomnio se ha asociado a una disminución del rendimiento laboral y un incremento de la tasa de accidentes de automóvil y una mayor propensión a padecer enfermedades.

La clasificación de enfermedades de la OMS, en su décima revisión, requiere para el diagnóstico de insomnio que la dificultad para iniciar o mantener el sueño, o no tener un sueño reparador, dure al menos un mes y que, además, se acompañe de fatiga diurna, sensación de malestar personal significativo y deterioro social, laboral o de otras áreas importantes de la actividad personal.

Los trastornos del sueño son un motivo de consulta frecuente, tanto en medicina general como en psiquiatría. Más del 50% de los pacientes de atención primaria se quejan de insomnio si se les pregunta por el sueño, pero sólo el 30% lo mencionan a su médico de cabecera por iniciativa propia y sólo el 5% acuden al médico con el objeto principal de recibir tratamiento para este problema. Se estima que de un 10% a un 15 % de la población adulta padece insomnio crónico. ⁽⁵⁸⁾

El resultado de numerosos estudios de pacientes con insomnio permite concluir que en la mayoría de los casos el insomnio es un síntoma de un trastorno subyacente más que una enfermedad en sí misma.

Existe una relación estrecha y bidireccional entre una persona sana y un sueño normal, debido a que el sueño cumple diversas funciones fisiológicas necesarias para la salud del individuo. Entre estas funciones está la de restaurar la homeostasis del Sistema Nervioso Central (SNC) y del resto de los tejidos, restablecer los almacenes de energía celular (ATP) y el almacenamiento y conservación de los datos en la memoria.

El sueño normal se compone de dos tipos de sueño: REM y No REM (Ver Figura N° 32) este último se compone a su vez en cuatro fases, cada una progresivamente más profunda. Se comienza la noche con la fase I del sueño No REM, pasando a otras fases hasta llegar a la fase 4 en la que la capacidad de respuesta a los estímulos ambientales es menor, siendo más difícil el despertar, de manera que si nos despertamos en esta fase nos encontramos desorientados, aturdidos, raramente recordamos los sueños y fácilmente volvemos a quedar dormidos. Durante este sueño No REM la actividad neuronal disminuye un 50% debido a la disminución del flujo sanguíneo cerebral. Las ondas del EEG son lentas y sincronizadas y la actividad colinérgica, noradrenérgica y serotoninérgica cerebral están disminuidas. (34, 58)

La primera fase del sueño REM ocurre, como media, a los 90 minutos tras el inicio del sueño, y se debe a la brusca activación de las neuronas colinérgicas, que estimulan el córtex visual y las áreas límbicas del cerebro. En esta fase del sueño el cuerpo es muy poco sensible a los estímulos externos y las motoneuronas de la médula espinal quedan como anestesiadas, mientras el pedúnculo cerebral produce ondas ponto-genículo-occipitales que activan el

núcleo geniculado y éste, a su vez, estimula el córtex visual produciendo imágenes. (34, 58)

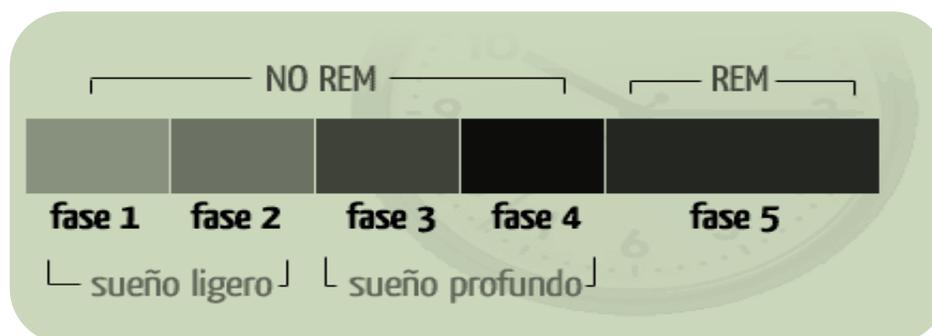


Figura Nº 32. Fases del sueño tipo REM y NO REM.

Durante el sueño REM mientras que el sistema colinérgico está activo el serotoninérgico permanece quiescente, y el EEG registra una actividad cerebral parecida a la del estado de vigilia (elevada frecuencia y escasa amplitud de ondas).

Con la edad, la estructura y el tiempo del sueño varían. Un recién nacido duerme aproximadamente 18 horas, un adulto joven de 7,5 a 8 horas y un anciano alrededor de 6,5 horas. En el recién nacido la fase REM ocupa más de un 50% del tiempo total del sueño, mientras que en el anciano ocupa tan sólo un 20%. De la tercera a la sexta década de la vida se produce una disminución gradual de la calidad del sueño, que se vuelve más fragmentado y superficial, se dan más cambios de fases del sueño y desaparece gradualmente el sueño de ondas lentas. (33)

3.5.1. Diagnóstico del insomnio

El diagnóstico se basa en una cuidadosa historia de los hábitos del sueño, apoyada por un registro del sueño realizado por el propio paciente y por la información aportada por la pareja o familiar.

Duración:

- Transitorio (menos 7 días)
- Corta duración (1 a 3 semanas)
- Crónico (más de 3 semanas)

Gravedad: según la repercusión o consecuencias en el estado de vigilia. ⁽³⁴⁾

Naturaleza

- Insomnio de conciliación
- Insomnio de mantenimiento
- Insomnio de despertar precoz
- Insomnio global

El estudio polisomnográfico es la técnica más empleada para el estudio del sueño por la riqueza de información que aporta. Se registra durante toda la noche la actividad eléctrica cerebral, los movimientos oculares, tono muscular, flujo de aire de cada respiración y movimientos respiratorios de tórax y abdomen. Este registro se representa mediante el hipnograma. Los estudios polisomnográficos realizados en pacientes con insomnio muestran alteraciones en la estructura del sueño (aumento de la latencia de sueño, frecuentes despertares) y reducción de la cantidad total de sueño. (58)

Sin embargo, no siempre se da una correlación positiva entre los parámetros polisomnográficos y la experiencia subjetiva del sueño en estos pacientes; algunos de ellos con una estructura del sueño alterada tienen la sensación de dormir bien. Esto ocurre en pacientes que duermen con benzodiazepinas (que suprimen la fase REM) y pacientes con apneas del sueño (que no duermen sueño REM). Y viceversa, pacientes que no presentan una alteración de la estructura del sueño por el contrario, sí tienen una percepción negativa de su dormir. (58) Por eso la polisomnografía se considera una prueba complementaria de la historia clínica y no una prueba diagnóstica. Hoy en día se emplea sobre todo cuando existe sospecha de padecer un síndrome de apneas obstructivas del sueño. (34, 58)

La actigrafía está indicada en el insomnio crónico y en las alteraciones del ritmo sueño-vigilia. Se lleva a cabo mediante un velocímetro que colocado en la muñeca registra los movimientos del brazo durante 2-14 días seguidos. Los movimientos son procesados mediante algoritmos matemáticos, obteniendo un registro de la actividad circadiana del paciente. Cuando no registra movimiento el paciente está dormido, por tanto se trata de una prueba indirecta para medir la cantidad de sueño. (58)

3.5.2. Clasificación del insomnio

Existen múltiples clasificaciones de los trastornos del sueño y por lo tanto del insomnio. Según sus causas el insomnio se clasifica como extrínseco e intrínseco; la diferencia entre ambos es que un insomnio extrínseco es debido a factores ambientales tales como problemas con la higiene del sueño, abuso de sustancias, situaciones de estrés y un insomnio intrínseco es debido a factores personales como el insomnio psicofisiológico, insomnio primario o idiopático, apneas obstructivas del sueño, síndrome de las piernas inquietas y alteración del ritmo circadiano. (34, 58, 63)

El insomnio se puede clasificar según su origen de la siguiente manera:

- Insomnio relacionado con una enfermedad orgánica (insomnio orgánico).
- Insomnio relacionado con trastornos mentales (insomnio no orgánico).
- Insomnio no relacionado con otras enfermedades (insomnio primario).

Según la duración el insomnio se clasifica así:

- a) Insomnio transitorio. Algunos factores que influyen pueden ser:
 - Cambio ambiental del sueño
 - Estrés situacional
 - Enfermedad médica aguda
 - Cambio de turno de trabajo. (58)

- b) Insomnio de corta duración. Duración de menos de tres semanas. Se desencadena en situaciones de estrés o de cambio vivencial: hospitalización, trauma emocional, dolor, vivir en altitud, casamiento, divorcio, cambio de residencia, reacción de duelo, etc.

c) Insomnio crónico. Debido a enfermedad física o psiquiátrica crónica. (58)

3.5.3. Insomnio asociado a enfermedades neurológicas

La epilepsia se acompaña de un aumento de la latencia del sueño, del número y la duración de los despertares, de la duración de las fases 1 y 2 del sueño, y de una disminución o fragmentación del sueño REM.

En la enfermedad de Parkinson las alteraciones más frecuentes son un aumento de la latencia del sueño, fragmentación del sueño, despertares frecuentes y un periodo de vigilia nocturna de un 40% de la noche. Estos trastornos del sueño aparecen en un 75% de los pacientes de estos pacientes. En las demencias se produce también un incremento de la latencia del sueño y del número de despertares. (33)

En la enfermedad de Alzheimer, a medida que se agrava, el ritmo circadiano pierde su ritmicidad y se hace polifásico dando lugar al llamado síndrome del anochecer o fenómenos de la puesta de sol (episodios de confusión vespertinos) acompañados de un incremento de la vigilia durante la noche e hipersomnias diurnas. (58)

3.5.4. Tratamiento del insomnio

El tratamiento del insomnio debe basarse en su origen, su severidad y su duración. Debido a que la mayoría de los insomnios son secundarios a alguna enfermedad, la clave de su tratamiento está en resolver dicha causa. Mientras se trata la causa se puede mejorar el sueño con medidas psicológicas y farmacológicas. (58)

Si bien es cierto que la adopción de unas sencillas medidas higiénico-dietéticas puede mejorar el tiempo y la calidad del descanso nocturno, en otros muchos casos se hace necesaria una intervención farmacológica, mediante la administración de fármacos que o bien corrijan factores tales como el estado de ansiedad o estrés o bien se comporten como inductores del sueño. (58)

3.5.4.1. Tratamiento no farmacológico

El tratamiento no farmacológico tiene algunas ventajas con respecto al farmacológico: es más económico, presenta menos efectos secundarios, el paciente es protagonista activo de su mejoría y a largo plazo, cuando es eficaz, tiene menos riesgo de recaídas.

Tiene el inconveniente de ser más difícil de poner en práctica ya que requiere cambios en los hábitos de vida exigen mayor dedicación por parte de los médicos y son pocos los terapeutas que dominan estas técnicas; es más sencillo y efectivo a corto plazo prescribir un hipnótico que persuadir al paciente de lo beneficiosos que son a largo plazo los cambios de hábitos. (63)

En muchas ocasiones conviene apoyarse temporalmente en los fármacos mientras se enseña a poner en práctica el tratamiento conductual escogido, de hecho los mejores resultados se han obtenido con la aplicación conjunta de medidas psicológicas y farmacológicas. (33)

3.5.4.2. Tratamiento farmacológico

Desde la antigüedad se han venido usando diferentes sustancias químicas obtenidas de plantas para inducir y mantener el sueño. Las más frecuentes son los extractos de plantas (valeriana, tila, pasiflora y opioides); algunas personas han acudido también a otro tipo de terapias como la homeopatía y productos “naturales” algunos de estos son sustancias que siguen siendo utilizadas con eficacia en el insomnio agudo de carácter transitorio, situacional y psicofisiológico, pero la mayoría de ellas pierden su eficacia en poco tiempo cuando se toman de modo continuado. (58)

Los barbitúricos hasta hace unas décadas fueron los fármacos más usados para combatir todos los tipos de insomnio. Debido a los numerosos casos de abuso, dependencia y suicidios con sobredosis se han dejado de usar como hipnóticos y están contraindicados en la actualidad.

Las benzodiazepinas (BZD) son agonistas no selectivos del complejo GABA. Han reemplazado a los barbitúricos como los hipnóticos de primera elección. Aunque son muy eficaces y de amplio uso en la actualidad, alteran la estructura del sueño disminuyendo el sueño REM y producen efectos secundarios significativos, a la vez que tolerancia y dependencia. Se deben emplear con precaución en algunos pacientes y conviene conocer bien cuáles son las contraindicaciones absolutas y relativas de estos fármacos. (63)

Los hipnóticos no benzodiazepínicos son agonistas selectivos del complejo GABA. Los buenos resultados que están mostrando, tanto en eficacia como en tolerancia, ha hecho que estén siendo indicados como hipnóticos de primera

elección, sobre todo en los casos de insomnio agudo pues en los insomnios crónicos graves no tienen tanta eficacia. (33)

El insomnio es la alteración del sueño más frecuente. Su incidencia en la población es alta y deteriora notablemente la calidad de vida de las personas que lo padecen, con repercusiones negativas en su actividad familiar, laboral y social. Se asocia a muchas enfermedades médicas y psiquiátricas siendo un factor predictivo de la enfermedad. (63) A pesar de su relevancia clínica y de su sencillo manejo, pasa con frecuencia inadvertido para los médicos a los que la falta de tiempo, de información o de recursos les impide un tratamiento adecuado del mismo. (58)

En los últimos años están apareciendo Unidades del Sueño en centros hospitalarios, integradas por especialistas de varias especialidades (neurofisiólogos, neurólogos, neumólogos, otorrinolaringólogos, psiquiatras, endocrinos, enfermeras, etc.) con el objetivo de un abordaje más profundo y global de la patología del sueño. (63)

3.6. Generalidades de la ansiedad

El mundo actual implica una época de grandes cambios, con ritmos de vida enormemente acelerado, mayor demanda de competencia y especialización. Este entorno exige a las personas mayor grado de autonomía, flexibilidad, capacidad de iniciativa, seguridad en sí mismo y capacidad para moldearse a situaciones nuevas, precisamente las contrariedades y exigencias que cotidianamente debe enfrentar el hombre propician estar sometido a muchos momentos de angustia. (33)

3.6.1. Origen de la palabra ansiedad

El término *ansiedad*, proviene del latín "*anxietas*", que significa congoja o aflicción. Consiste en un estado de malestar psicofísico caracterizado por una sensación de inquietud, intranquilidad, inseguridad o desosiego ante lo que se vivencia como una amenaza inminente y de causa indefinida. La diferencia básica entre la ansiedad normal y la patológica, es que ésta última se basa en una valoración irreal o distorsionada de la amenaza.

La angustia es una manifestación emocional caracterizada por un temor a lo desconocido o a lo amenazante. Este temor se contrapone al miedo, que es un temor a algo concreto y definido (objeto o situación). Cuando la ansiedad es muy severa y aguda, puede llegar a paralizar al individuo, transformándose en pánico. (33)

Según su origen, la angustia puede presentarse de diferentes maneras. Existe una angustia que puede ser considerada normal, pues aparece frente a diversos estímulos estresantes, que implican una amenaza real e imponen un desafío. Si, por el contrario, la valoración de una amenaza es errónea o distorsionada o el estímulo es imaginario, se genera una angustia que tiende a persistir, transformándose en anormal o patológica. Es decir que, la angustia normal se basa en preocupaciones presentes o del futuro inmediato y desaparece al resolver los problemas la angustia patológica, antes llamada neurótica, es de medida y persistente, planeando un futuro incierto o amenazante y va restringiendo la autonomía y desarrollo personal de quien la sufre. (63)

3.6.2. Principales síntomas de la ansiedad

Los síntomas característicos de los Trastornos de Ansiedad difieren de los sentimientos habituales de nerviosismo e inquietud en que se manifiestan externamente como reacciones desproporcionadas y/o injustificadas ante estímulos o situaciones ambientales cotidianas, reacciones que escapan del control voluntario de la persona, tienen un carácter intenso y recurrente, generan incomodidad y malestar e interfieren significativa y negativamente en la vida de la persona en múltiples niveles.

El Panorama de respuestas de ansiedad han sido agrupadas en tres sistemas de respuesta humana: síntomas subjetivos, cognitivos o de pensamiento, y dentro de estos se hace referencia a dos tipos: síntomas de preocupación y síntomas motores u observables. (63)

1. Preocupación

- Inseguridad.
- Miedo o temor.
- Aprensión.
- Pensamientos negativos (inferioridad, incapacidad).
- Anticipación de peligro o amenaza.
- Dificultad de concentración.
- Dificultad para la toma de decisiones.
- Sensación general de desorganización o pérdida de control sobre el ambiente.

2. Motores u observables

- Hiperactividad.
- Paralización motora.
- Movimientos torpes y desorganizados. (63)

- Tartamudeo y otras dificultades de expresión verbal.
- Síntomas cardiovasculares: palpitaciones, pulso rápido, tensión arterial alta y accesos de calor.
- Síntomas respiratorios: sensación de sofoco, ahogo, respiración rápida y superficial y opresión torácica.
- Síntomas gastrointestinales: náuseas, vómitos, diarrea, aerofagia y molestias digestivas.
- Síntomas genitourinarios: micciones frecuentes, enuresis, eyaculación precoz y frigidez, impotencia.
- Síntomas neuromusculares: tensión muscular, temblor, hormigueo, dolor de cabeza tensional y fatiga excesiva.
- Síntomas neurovegetativos: sequedad de boca, sudoración excesiva y mareos. (63)

3.6.3. Clasificación de los tipos de trastornos de ansiedad

- 1. Trastorno de ansiedad por la separación:** Es la ansiedad excesiva por la separación del niño del hogar o de aquellos a quienes el niño está ligado.

La persona puede desarrollar una preocupación excesiva al punto de que puede ponerse reacio o negarse a ir a la escuela, estar solo o dormir solo. Las pesadillas repetitivas y las quejas acerca de síntomas físicos (tales como el dolor de cabeza, dolor de estómago, náusea o vómitos) pueden ocurrir.

- 2. El Trastorno de ansiedad generalizada:** Es la ansiedad excesiva y preocupación sobre los eventos o actividades, tal como el asistir a la escuela o trabajo. (63)

Las personas con trastorno de ansiedad generalizada (TAG) pasan el día llenas de preocupaciones y tensiones exageradas, incluso cuando hay poco o nada que las provoque. Tales personas esperan desastres y están demasiado preocupadas por asuntos de salud, dinero, problemas familiares, o dificultades laborales. En ocasiones, el simple pensamiento de cómo pasar el día produce ansiedad.

- 3. El trastorno de pánico:** Es la presencia recurrente e inesperada de ataques de pánico y preocupaciones persistentes acerca de tener los ataques.

Los ataques de pánico se refieren a la ocurrencia repentina de temores intensos, miedo o terror, a menudo asociados con sentimientos de desgracia inminente. También puede sentirse corto de respiración, con palpitaciones, dolor de pecho o incomodidad, sensaciones de ahogo y asfixia y el temor de "volverse loco" o perder el control.

- 4. Las fobias:** Son los temores persistentes e irracionales de un objeto específico, actividad o situación. (63)

3.6.3.1. Trastorno de ansiedad generalizada (TAG)

El TAG se diagnostica cuando una persona se preocupa excesivamente acerca de diversos problemas de la vida diaria durante por lo menos seis meses. Las personas con TAG parecen incapaces de liberarse de sus preocupaciones, a pesar de que usualmente son conscientes de que su ansiedad es más intensa de lo que amerita la situación, no se pueden relajar, se asustan con facilidad, y tienen dificultades para concentrarse. (33, 63)

Los síntomas físicos que con frecuencia acompañan la ansiedad incluyen fatiga, dolores de cabeza, tensiones musculares, dolores musculares, dificultad para tragar, temblores, tics nerviosos, irritabilidad, transpiración, náuseas, mareos, necesidad de ir al baño con frecuencia, sensación de falta de aire, con frecuencia tienen problemas para dormir o mantenerse dormidas y repentinos acaloramientos.

Cuando sus niveles de ansiedad son moderados, las personas con TAG pueden funcionar socialmente y mantener un trabajo, aunque no evitan ciertas situaciones como resultado de su trastorno, pueden tener dificultades para llevar a cabo las actividades más sencillas de la vida diaria si su ansiedad es grave.

El trastorno se desarrolla gradualmente y puede comenzar en cualquier punto del ciclo de vida, aunque los años de mayor riesgo son aquéllos entre la infancia y la mediana edad. Otros trastornos de ansiedad, depresión, o abuso de sustancias, pueden acompañar el TAG, el cual rara vez ocurre por sí solo. Normalmente se trata con medicación o con terapia cognitiva-conductual, pero las enfermedades coexistentes también deben ser tratadas con las terapias apropiadas. (63)

3.6.4. Tratamiento para los trastornos de ansiedad

En general, los trastornos de ansiedad se tratan con medicación, tipos específicos de psicoterapia, o ambos. Antes de comenzar un tratamiento, un médico debe realizar una evaluación diagnóstica cuidadosamente para determinar si los síntomas de una persona son causados por un trastorno de ansiedad o por un problema físico, si se diagnostica un trastorno de ansiedad,

el tipo de trastorno o la combinación de trastornos presentes deben identificarse, al igual que cualquier enfermedad coexistente, tales como depresión o abuso de sustancias. (63)

En ocasiones, el alcoholismo, la depresión, u otras enfermedades coexistentes tienen un efecto tan fuerte sobre el individuo, que el tratamiento del trastorno de ansiedad debe esperar hasta que las enfermedades coexistentes queden bajo control.

Las personas con trastornos de ansiedad que ya hayan recibido tratamiento deben informar en detalle a su respectivo médico acerca de tal tratamiento, si estas personas recibieron medicamentos, deben informar qué medicación se utilizó, qué dosis se usó al comienzo del tratamiento, si la dosis se aumentó o disminuyó durante el tratamiento, qué efectos secundarios se presentaron, y si el tratamiento les ayudó a reducir la ansiedad. En caso de que hubiesen recibido psicoterapia, deben describir el tipo de terapia, con qué frecuencia asistieron a sesiones, y si la terapia fue útil.

Con frecuencia, las personas creen que han “fallado” un tratamiento o que el tratamiento no les funcionó, cuando, en realidad, el tratamiento no se suministró por un periodo adecuado de tiempo o fue administrado incorrectamente, en ocasiones, las personas deben tratar varios tipos diferentes de tratamientos, o combinaciones de los mismos, antes de que puedan encontrar uno que les funcione. (63)

3.6.4.1. Medicamentos ansiolíticos

Las benzodiazepinas combaten la ansiedad y producen pocos efectos secundarios con la excepción de somnolencia (tener sueño), debido a que las personas se pueden acostumbrar a éstas y pueden necesitar dosis progresivamente más altas para obtener el mismo efecto, generalmente se prescriben por cortos periodos de tiempo, en especial para personas que han abusado de drogas o alcohol o que con facilidad se vuelven dependientes a la medicación. Una excepción a esta regla son las personas que padecen de trastorno de pánico, quienes pueden tomar benzodiazepinas por hasta un año sin que se produzcan daños.

El clonazepam (Klonopin[®]) se usa para la fobia social y el TAG, el lorazepam (Ativan[®]) es utilizado para el trastorno de pánico, y el alprazolam (Xanax[®]) es utilizado tanto para el trastorno de pánico como para el TAG.

Algunas personas pueden experimentar síntomas de abstinencia si dejan de tomar abruptamente las benzodiazepinas, en vez de reducirlas progresivamente, y la ansiedad puede volver una vez que se deja la medicación. La buspirona (Buspar[®]), una azapirona, es un medicamento ansiolítico más nuevo que se usa para el tratamiento del TAG. Entre los posibles efectos secundarios incluyen mareos, dolores de cabeza, y náuseas, a diferencia de las benzodiazepinas, la buspirona se debe tomar consistentemente por lo menos durante dos semanas para lograr un efecto ansiolítico. (63)

3.7. Métodos de ensayo en toxicología

La mayoría de los estudios mecanicistas inicia con una descripción toxicológica referida a animales o a observaciones clínicas en humanos. Idealmente, los estudios con animales comprenden cuidadosas observaciones clínicas y de comportamiento un minucioso examen bioquímico de los elementos de la sangre y la orina en busca de signos de deterioro funcional en los principales sistemas biológicos del cuerpo, y una evaluación post-mortem de todos los sistemas orgánicos mediante un examen microscópico para comprobar la lesión (43)

Comprender los mecanismos de la toxicidad es el arte y la ciencia de la observación, de la creatividad en la selección de técnicas para ensayar diversas hipótesis, y de la integración innovadora de signos y síntomas en una relación causal. Los estudios se inician con la exposición haciendo un seguimiento de la distribución temporal y el destino en el organismo (farmacocinética) para luego medir el efecto tóxico resultante a nivel del sistema y de dosis. (52)

3.8. Uso de animales de experimentación

El animal de experimentación es una de las piezas fundamentales en la biomedicina tanto en los proyectos de investigación como en las pruebas diagnósticas y en los controles de productos farmacológicos. La ciencia de animales de laboratorio fue creada para ayudar a la comunidad científica a mejorar todos los aspectos concernientes a la experimentación animal. Cabe destacar que el número de animales utilizados debe ser el mínimo necesario para poder evaluar la hipótesis y dar resultados estadísticamente útiles. Por lo tanto podemos resumir que la ciencia de los animales de laboratorio se ocupa simultáneamente de mejorar la investigación biomédica y de asegurar el bienestar animal. (43)

La experimentación animal es hoy en día una actividad básica de la ciencia médica ya que los resultados encontrados en los animales son parcialmente aplicables al hombre; el uso del animal como fuente de conocimientos experimentales tiene ya una larga tradición; toda la moderna farmacología, fisiología, la toxicología y la psicología, solo por mencionar algunas disciplinas de evidente aplicación, que se han basado en someter animales a experimentos o en observar la ocurrencia espontánea de fenómenos en ellos. La estructura de las ciencias médicas sería inconcebible sin el empleo de animales y sin su sometimiento a condiciones que la conciencia moral prohíbe imponer a seres humanos. (6)

El animal de laboratorio es aquel que es engendrado y producido en condiciones controladas, además es mantenido en un entorno controlado, posee claros antecedentes genéticos y microbiológicos. También es definido como cualquier especie animal que, mantenido bajo determinadas condiciones controladas es utilizado como instrumento de medida en experimentación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y docencia, para la generación de datos, los cuales son utilizados como información. Ejemplo de estas especies son: el ratón, la rata, el hámster, el conejo, el perro, el mono y otros. (23)

3.9. Ratón de laboratorio

El ratón de laboratorio es un roedor usualmente de la especie ***Mus musculus*** que se utiliza para la investigación científica con frecuencia los ratones de laboratorio son blancos los cuales deben pertenecer a una cepa pura o endogámica. Los individuos de una misma cepa llevan los mismos genes, por lo cual se facilita la comparación de los efectos de los diferentes tratamientos sin que produzca confusión debido a las diferencias genéticas. (43)

Las características que han hecho del ratón de laboratorio el modelo biológico y biomédico más utilizado en las investigaciones científicas son:

1. Fácil manejo
2. Tamaño apropiado para la crianza y manipulación
3. No requieren demasiados cuidados
4. Tienen un sistema inmune similar al de los seres humanos
5. Tienen un alto nivel de crías
6. Poseen un breve periodo de gestación y rápido destete
7. Las hembras producen un número de óvulos los cuales al ser fecundados son muy resistentes
8. Al ser mamíferos euterios al igual que el hombre tienen un genoma muy similar a los humanos diploide. ⁽⁴³⁾

3.10. Lineamientos para pruebas de productos químicos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE).

Se trata de un conjunto de normativas que llevan actualizándose desde hace más de 20 años, entre sus funciones, podríamos destacar en primer lugar, la acreditación de los laboratorios que cumplen una serie de características para poder llevar a cabo en ellos la experimentación de productos químicos o farmacéuticos según las buenas prácticas de laboratorio (BPL). Y, en segundo lugar, especifican cómo se han de realizar dichas pruebas de productos químicos o farmacéuticos; estas especificaciones están minuciosamente detalladas, de modo que no dejan lugar a la improvisación. ⁽⁵¹⁾

Las normas o lineamientos de OCDE son una colección de los métodos más relevantes usados internacionalmente, procedimientos acordados por el gobierno, la industria y laboratorios independientes para determinar la seguridad de productos químicos y farmacéuticos, incluyendo pesticidas y productos químicos industriales, las cuales incluyen pruebas para las propiedades físicas y químicas de productos químicos, pruebas que puedan señalar efectos de salud humana, ambientales, la degradación y su acumulación en el entorno.

Probablemente, un protocolo realizado según la normativa BPL sea lo más sencillo de revisar por un Comité de Ética de Experimentación Animal, aunque obliga a bastante trabajo por sus requisitos de calibración, limpieza, etc., de los equipos. Pueden encontrarse las normativas concretas para la realización de la experimentación animal, por mencionar las de empleo más frecuente: la Guideline 420: Acute Oral Toxicity Fixed Dose Procedure⁴⁸, la Guideline 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method y la Guideline 425: Acute Oral Toxicity ⁽⁵¹⁾. Las revisiones de estas guías son constantes, y tienden a afinar progresivamente en los principios éticos que hemos mencionado anteriormente: minimizar el sufrimiento de los animales, disminuir el número de animales y emplear sistemas alternativos igualmente fiables. ⁽⁵¹⁾

3.10.1. Toxicidad aguda oral

Las pruebas de laboratorio deben considerar toda la información disponible sobre la sustancia de prueba antes de iniciar el estudio. Tal información incluirá la identidad y la estructura química de la sustancia; sus propiedades fisicoquímicas; el resultado *in vivo* o la toxicidad *in vitro*, datos toxicológicos sobre las sustancias estructuralmente relacionadas; y el empleo esperado de la

sustancia. Esta información es necesaria para la protección del bienestar y salud humana y ayudará en la selección de la dosis inicial apropiada.

El principio de estos lineamientos está basado en un procedimiento gradual con el empleo de un número mínimo de animales por paso, la información final obtenida sobre la toxicidad aguda de la sustancia ensayada es suficiente para permitir su clasificación. La sustancia es administrada oralmente a un grupo de animales experimentales en una de las dosis definidas. La ausencia o la presencia de mortalidad de los animales medicados en un paso determinarán el siguiente paso. ⁽⁵⁰⁾

3.10.1.1. Prueba límite aguda

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), determina que la prueba límite es usada principalmente en situaciones donde el investigador tiene la información que indica que el material de prueba probablemente sea no tóxico, es decir, la sustancia de ensayo posee una toxicidad por encima de la dosis de límite permitida. La Información sobre la toxicidad del material de prueba puede ser obtenida del conocimiento sobre compuestos similares probados o mezclas similares y la cantidad de sustancia necesaria para causar un efecto toxicológico.

Una prueba límite aguda de 2000 mg/kg de peso corporal puede ser realizada con seis animales; si existe mortalidad relacionada con la sustancia de prueba, se debe realizar la prueba con la dosis inmediata inferior. ⁽⁵⁰⁾ (Ver anexo N°2)

3.10.2. Toxicidad sub-aguda oral por administración continua (28 días) vía oral

El principio de este procedimiento consiste en la administración oral de la sustancia de ensayo a varios grupos de animales experimentales durante el periodo de 28 días. Durante el período de administración los animales son observados cada día para poder observar los signos de toxicidad. Los animales que mueren durante la prueba son evaluados mediante una necropsia y para clasificar la sustancia es necesario evaluar a los animales sobrevivientes, los cuales son sacrificados para poder ser examinados internamente y así poder observar posibles efectos tóxicos de la sustancia administrada. ⁽⁵¹⁾

3.10.2.1. Prueba limite sub-aguda

Generalmente, cuando se obtiene información sobre la sustancia de ensayo, se realiza una prueba a una dosis de 1000 mg/kg de peso corporal, si no produce efectos tóxicos observables y si estudios anteriores revelan un bajo nivel de toxicidad de compuestos estructuralmente relacionados, entonces un estudio una prueba límite 2000 mg/Kg puede ser ejecutada. ⁽⁵¹⁾ (Anexo N° 2)

3.11. Pruebas para evaluar la actividad ansiolítica en ratones

Uno de los recursos científicos para corroborar el sustento biológico del efecto de la medicina tradicional, es recurrir al uso de pruebas en modelos animales sensibles de manifestar modificaciones de conducta en el sujeto de estudio, al administrarle sustancias con efecto ansiolítico.

Durante los últimos 50 años, se ha desarrollado un gran número de pruebas en animales para identificar compuestos que potencialmente tienen actividad ansiolítica. ⁽⁵⁵⁾

Asimismo, se han hecho utilizando agonistas, antagonistas o ambos, de receptores de los sistemas de neurotransmisores que participan en este proceso, para identificar el mecanismo neuronal por el cual logran este efecto. El utilizar modelos de ansiedad con ratones, ofrece la ventaja de ensayar en ellos diversas técnicas experimentales que en los seres humanos no sería posible. Cuando se exploran extractos y alcaloides (sustancias en estudio) que se extraen de los diferentes órganos de las plantas, por lo regular dichas sustancias se obtienen en cantidades pequeñas y el utilizar ratones permite el óptimo empleo de este recurso. (55)

3.11.1. Pruebas no condicionadas

Las pruebas en roedores se pueden clasificar en condicionadas y no condicionadas. Las primeras requieren necesariamente del entrenamiento exhaustivo de los animales, que son expuestos a estímulos no habituales para determinar efectos sobre la memoria/ aprendizaje, el apetito o la función perceptual. (55)

Por el contrario, las pruebas no condicionadas no requieren de entrenamiento, por lo que son menos sensibles a procesos motivacionales y se basan en respuestas espontáneas de la conducta del ratón; éstas han permitido el desarrollo de una serie de paradigmas basados en la observación de una variedad de conductas del roedor y la mayoría de los procedimientos conductuales para el estudio farmacológico de la ansiedad se basan en este tipo de pruebas.

Entre las pruebas de mayor uso se encuentran: la de campo abierto, laberinto elevado, de la caja luz/oscuridad, de choque/enterramiento, de enterramiento de canicas y la plataforma agujereada. (55)

El laberinto elevado es un modelo válido para evaluar la ansiedad, porque utiliza estímulos naturales, miedo a los espacios abiertos y miedo caminar sobre una plataforma elevada y relativamente estrecha, que inducen ansiedad en los humanos; también se considera que el miedo que genera en los roedores se debe a la falta de estímulos tigmotácticos. Originalmente desarrollada con ratas, en la actualidad se ha valido su uso con ratones. La disminución de la actividad exploratoria es causada por miedo a los espacios abiertos y el uso de compuestos ansiolíticos incrementa esta actividad.

La prueba de enterramiento de canicas consiste en contabilizar el número de canicas que el ratón entierra en el aserrín durante un periodo de 30 minutos. Los roedores usan el material de su caja para enterrar los objetos que consideran nocivos o amenazantes; sobre esta base, las canicas de vidrio se encuentran entre los estímulos que les ocasiona miedo y aversión. Esto podría ser resultado de la novedad que estos objetos representan en su medio ambiente y el entierro de las canicas se vería como la conducta apropiada porque quita la fuente del estímulo que causa aversión. (55)

La inhibición de esta conducta ha sido propuesta como prueba para identificar compuestos ansiolíticos Alternativamente, se ha propuesto que el enterramiento es una conducta compulsiva, porque los inhibidores de la recaptura de serotonina que se utilizan para tratar la alteración obsesivo-compulsiva en humanos inhiben esta conducta.

La prueba de la plataforma agujereada fue introducida en 1962 por Boisser y Simón, donde el uso de esta prueba para evaluar sustancias ansiolíticas se basa en la hipótesis de Montgomery (1955) de que la exposición a un nuevo ambiente le crea al ratón un conflicto entre el temor generado por la novedad de la situación y su tendencia natural a explorar. (55)

El ensayo se hace colocando el animal en el centro de la plataforma y se evalúa la actividad registrando el número de veces que el animal espía (*headdipping*) los orificios. Se considera “espíar” cuando el ratón introduce la cabeza dentro de los agujeros hasta las orejas. El número de exploraciones guarda una relación inversa con el estado de ansiedad del animal; los compuestos ansiolíticos, como las benzodiazepinas, incrementan de manera dependiente de la dosis, el número y la duración de las espíadas a los orificios.

Se reconoce que la ansiedad, como alteración generada por el estilo de vida actual, es un problema de salud mundial, es por esto que es necesario el estudio de plantas usadas en la medicina tradicional, con el apoyo de pruebas en modelos animales, lo cual nos abre la posibilidad de explorar la riqueza etnobotánica de nuestro continente, buscando alternativas terapéuticas. (55)

3.12. Prueba de sueño inducido para evaluar la actividad sedante

La potenciación del sueño es una de las pruebas de sedación que permite medir la influencia de los medicamentos o plantas medicinales sobre la duración del sueño inducida por un hipnótico. Este método es utilizado para el estudio de los psicolépticos, es decir: los hipnóticos, los neurolépticos o tranquilizantes mayores y los tranquilizantes menores. El criterio es la pérdida del reflejo de enderezamiento que permite anotar el tiempo de adormecimiento. El regreso del reflejo de enderezamiento marca la finalización de la prueba. (3)

CAPÍTULO IV

DISEÑO METODOLÓGICO

4. DISEÑO METODOLÓGICO.

4.1. Tipo de estudio

La presente investigación es un **estudio retrospectivo** porque está basada en estudios anteriores de las propiedades sedantes y ansiolíticas del género *Erythrina*. Es un **estudio experimental** porque a partir de resultados de laboratorio, usando animales de experimentación, se podrá descartar los posibles efectos tóxicos atribuidos popularmente y además determinar dichas propiedades farmacológicas, de manera que el presente trabajo sea un **estudio prospectivo** proyectándose a ser una nueva alternativa para el tratamiento natural del insomnio y la ansiedad

A partir de la información retomada de referencias bibliográficas, se formula la siguiente hipótesis:

“El extracto acuoso de las flores de *Erythrina berteroana* no posee efectos tóxicos y posee propiedades sedantes y ansiolíticas a las concentraciones de 100, 250 y 500 mg/Kg en ratones NIH”

4.2. Investigación bibliográfica

Se realizaron consultas en publicaciones científicas, libros, trabajos de graduación, etc. en:

- Universidad de El Salvador: en la biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia, Biblioteca Central, y Biblioteca de la Escuela de Biología.
- Universidad Evangélica de El Salvador: Biblioteca Central.
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer: Biblioteca Central.
- Revistas científicas, Ej: Journal of Natural Products, Journal of Ethnopharmacology, Biological and Pharmaceutical Bulletin, Natural Product Sciences, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, Archives of Pharmacal Research entre otras.
- SciFinder Scholar (base de datos del American Chemical Society).
- Internet.

4.3. Investigación de campo

Previo a la recolección se presentó una muestra de la especie vegetal en el Herbario del Jardín Botánico de La Laguna para su identificación por un Botánico experto. (Ver Anexo N° 1)

La recolección de las flores se realizó en el Municipio de Apopa, Departamento de San Salvador, El Salvador; desde enero hasta el mes de abril de 2011.

Universo: Árboles de *Erythrina berteroana*

Muestra: flores de *Erythrina berteroana*

Las flores se secarán a temperatura ambiente, se pulverizarán y se almacenarán en un lugar fresco y seco.

4.4. Parte Experimental. Investigación de laboratorio

4.4.1. Obtención del extracto acuoso de las flores de *Erythrina berteroana* e identificación de alcaloides

Las flores secas fueron pulverizadas y mediante el método de extracción de reflujo, se extrajo 3 veces (7 horas cada vez), utilizando como disolvente agua destilada.

4.4.1.1. Liofilización del extracto acuoso

El extracto se sometió al proceso de liofilización, con la finalidad de eliminar el solvente de extracción, en este caso, agua destilada. En primer lugar, el extracto fue congelado a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y después por sublimación el disolvente se eliminó a través de un sistema de vacío, mediante un aparato liofilizador, marca Christ Alpha 2-4, LDC-1M (Ver Figura N° 33).

Las muestras congeladas se introdujeron en la urna-bandeja de vacío a una temperatura de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se colocaron en las gomas azules del liofilizador, balones de 250 mL con aproximadamente 25 mL de extracto acuoso (Ver Figura N° 33); este proceso se realizó durante dos semanas, 6 horas diarias. El producto resultante es un polvo liofilizado, que debe ser reconstituido en el momento de su utilización.



Figura N° 33. Aparato Liofilizador (Christ Alpha 2-4, LDC-1M)

4.4.1.2. Identificación de Alcaloides

4.4.1.2.1. Pruebas químicas de precipitación:

Se trabajó con dos muestras, una el extracto acuoso (crudo) recién obtenido de flores de *Erythrina berteroana* (pito), y otra el extracto acuoso liofilizado. El extracto acuoso obtenido se filtró y de este se tomaron 20 mL, luego en baño de maría el filtrado se concentró a sequedad, después adicionando HCl al 10% se obtiene un pH=1, esta solución se filtró distribuyéndolo en tres tubos, seguidamente se realizaron pruebas químicas cualitativas de precipitación: Mayer, Wagner y Dragendorff, para la identificación de alcaloides. Se pesó 1 g del producto liofilizado, el cual se regeneró con 1 mL de agua destilada, seguidamente se realizó el mismo procedimiento al que fue sometido el extracto crudo anteriormente descrito.

Tabla N° 2. Evidencia positiva para las pruebas de precipitación para alcaloides

Reactivo de Mayer	Reactivo de Wagner	Reactivo de Dragendorff
Precipitado Blanco	Precipitado marrón	Precipitado rojo ladrillo

4.4.1.2.2. Cromatografía en capa fina:

La cromatografía en capa fina se realizó sobre una placa (5 x 6 cm) de gel de sílice tipo G, de 0.25 mm de espesor, tomando en cuenta condiciones específicas que se describen a continuación en la Tabla N° 3

Tabla N° 3. Condiciones para realizar cromatografía en capa fina.

Fase Estacionaria	Sílica gel.
Fase Móvil	CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (2: 7.5: 0.5) CHCl ₃ :MeOH:Acetona (2: 7: 1)
Muestra	<ul style="list-style-type: none"> • Extracto acuoso de las flores de <i>Erythrina berteroana</i>. • Extracto acuoso liofilizado de las flores de <i>Erythrina berteroana</i>. (reconstituido con metanol y agua destilada)
Testigo	Clorhidrato de quinina
Revelador	Reactivo de Dragendorff.
Evidencia	Manchas de color naranja

4.4.2. Determinación de toxicidad del extracto acuoso liofilizado

4.4.2.1. Ensayo de toxicidad aguda oral

Según el protocolo de la *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) en su Guideline for Testing of Chemical N° 423, numerales 19, 22 y 23 ⁽⁴⁹⁾; cuando la mortalidad es poco probable sugiere iniciar con un ensayo a una dosis límite de 2000 mg/Kg, y debido a que no hay datos reportados de toxicidad a dosis bajas del género *Erythrina*; se determinó no realizar el ensayo de toxicidad aguda oral, avanzando a la siguiente etapa según el diseño metodológico: la toxicidad subaguda a dosis repetidas de 28 días.

4.4.2.2. Ensayo de toxicidad subaguda por administración continua (28 días) vía oral dosis límite de 2000 mg/kg de peso.

4.4.2.2.1. Animales experimentales.

Para el ensayo se emplearon ratones NIH de ambos sexos, con peso corporal que puede variar entre 20 y 30 g, con aproximadamente un mes una semana de nacidos, todos procedentes del Laboratorio de Experimentación Animal de CENSALUD, donde fueron mantenidos a una temperatura de 20 ± 2 °C, a una humedad relativa entre 50 y 70%, con un ciclo luz-oscuridad de 12/12 horas. Se marcaron con ácido pícrico para su identificación individual. La alimentación consistió en una dieta estándar a base de concentrado peletizado para roedor y agua a voluntad. Todos los animales fueron examinados clínicamente antes del ensayo para certificar su estado de salud. (10, 51)

4.4.2.2.2. Dosis y vía de administración

La sustancia de ensayo se disolvió en agua destilada, haciendo una dilución acuosa y para la preparación de ésta se fue ajustando en base al peso promedio de cada grupo de ratones registrado semanalmente y la administración se realizó vía oral empleando una cánula intragástrica, sin exceder el volumen máximo de 0.2 ml. (Ver Anexo N° 3).

4.4.2.2.3. Procedimiento experimental

Se confeccionaron 6 grupos experimentales (3 grupos hembras y 3 grupos machos) cada grupo constituido por 5 animales; de los cuales 4 grupos: 2 **tratamiento** y 2 **centinela** fueron tratados con la sustancia en estudio y los dos restantes se utilizaron como controles a los que se les administró agua destilada siendo manipulados de la misma forma que los grupos tratados con la sustancia en estudio.

La sustancia de ensayo se administró a los grupos tratamiento y centinela a una dosis de 2000 mg/kg de peso corporal, en condiciones óptimas, seis días por semana durante un período de 28 días. Los animales de los lotes centinela previstos para las observaciones complementarias se conservaron en observación durante 14 días más, sin tratamiento, con el fin de descubrir la recuperación o la persistencia de los posibles efectos tóxicos.

4.4.2.2.4. Observaciones durante el estudio.

Se realizó una revisión clínica detallada antes de la primera exposición (para poder realizar comparaciones al mismo individuo), y a partir de entonces la observación clínica se realizó en todos los animales diariamente. (10, 51)

Estas observaciones se hicieron fuera de la jaula de alojamiento en un ambiente normal especificado anteriormente, en donde se registraron sistemáticamente los signos clínicos de los principales sistemas de órganos que pudieron evaluarse macroscópicamente y que incluyen: piel, ojos y membranas mucosas, sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, actividad somatomotora y patrones de comportamiento (Ver Tabla N° 4) (10, 51)

Tabla N° 4. Descripción de parámetros de toxicidad en animales de experimentación.

Apariencia del pelo	Textura, color, caída.
Apariencia de la piel	Enrojecimiento, sequedad, exudación.
Ojos y membranas mucosas	Enrojecimiento, sequedad, secreción anormal.
Ataxia	Pérdida del equilibrio, caminata errática
Parálisis	Pérdida de respuesta en cualquier extremidad
Reacción a estímulos	Respuesta al tacto o al ruido
Vasoconstricción periférica	Palidez
Vasodilatación periférica	Enrojecimiento
Pilo-erección	Pelaje erizo
Salivación	Exceso de secreción bucal
Actividad Motora	Aumento o disminución de la actividad normal, refleja o no.
Tremores y Convulsiones	Contracción muscular anormal espontánea. Contracción o estiramiento muscular descontrolado.
Respiración	Aumento o disminución en la frecuencia respiratoria.
Deshidratación	Prueba de Robinou: pellizco de la piel, sin el retorno de esta a su posición normal.
Diarrea	Heces blandas o deposición acuosa.

Los animales se observaron diariamente cuidadosamente después de la canulación al menos durante los primeros 30 minutos, periódicamente durante las primeras 24 hrs con especial énfasis durante las primeras 4 hrs. (10, 51)

4.4.2.2.5. Registro de peso corporal de los grupos experimentales

Los cambios en el peso corporal en animales de experimentación son un criterio concluyente en la determinación de la toxicidad de una sustancia. Los días 1, 7, 14, 21 y 28, se registró el peso corporal de cada uno de los animales y a partir de este registro se hicieron las dosis a administrar cada semana. (10, 51)

4.4.2.2.6. Exámenes hematológicos

Mediante muestras de sangre de cada individuo (Ver Anexo N° 9) se determinó la hemoglobina, hematocrito, recuento diferencial de leucocitos y recuento total de eritrocitos.

Se tomó muestra de sangre de cada animal experimental mediante la técnica de extracción de sangre de seno retro-orbital sujetando al ratón estirando la piel del cuello hacia atrás asegurándose de no dificultar la respiración, inmediatamente se introdujo un capilar heparinizado en el ángulo externo del ojo (2 mm aproximadamente) y se gira suavemente hasta que la sangre fluya por el mismo. Finalmente se retiró el capilar y se aplicó pomada oftálmica al ojo.

Con la muestra obtenida mediante la técnica descrita anteriormente se determinará: hemoglobina, hematocrito, recuento diferencial de leucocitos y recuento total de eritrocitos (7, 9, 10, 51)

El recuento diferencial de leucocitos se obtuvo con la técnica de Coloración de Wright; en donde se hizo un extendido de la muestra de sangre sobre una placa y se dejó secar. Después se tiñó con colorante de Wright, al cabo de 8 minutos se lavó con agua corriente y se dejó secar a temperatura ambiente, finalmente se observó al microscopio con el objetivo de 100X. (Ver Anexo N° 8)

4.4.2.2.7. Sacrificio y necropsias.

Transcurridos los 28 días del estudio, y su posterior toma de muestra de sangre, se sacrificaron los animales por dislocación cervical para la necropsia y se revisaron los siguientes órganos: corazón, pulmones, riñones, hígado, estómago, bazo, intestino delgado e intestino grueso.

Se realizó un examen exhaustivo de la apariencia, superficie, consistencia, y color de cada órgano; con el fin de obtener datos suficientes para establecer la presencia o ausencia de lesiones. Mediante este tipo de información se complementó la interpretación de los resultados obtenidos en los exámenes hematológicos y las variaciones de peso corporal. ^(10, 51)

4.4.2.2.8. Exámenes histopatológicos.

Los órganos evaluados durante la necropsia se preservaron en formalina al 10%. Los órganos más susceptibles a sufrir algún tipo de lesión por ser los encargados del metabolismo y eliminación de sustancias tóxicas en el organismo, hígado y riñón, fueron procesados por medio de la técnica histopatológica clásica para bloques parafinados, cortadas en 5µm con un micrótopo (Ver Figura N° 34) y coloreadas con hematoxilina–eosina, para luego ser leídos al microscopio por el patólogo. ⁽⁵¹⁾ (Ver Anexo N° 8)



Figura N° 34. Micrótopo rotatorio (equipo para realizar cortes histológicos) ubicado en el Laboratorio de Patología, 3er nivel del edificio de CENSALUD, Universidad de El Salvador.

4.4.2.2.9. Análisis estadístico.

Todos los datos obtenidos en cada uno de los parámetros fueron estadísticamente evaluados con el software SPSS 18.0. La prueba de hipótesis incluye el análisis T de Student para muestras relacionadas y para muestras independientes. Se consideró que la diferencia (P) entre los grupos tratados y el grupo control es significativa cuando $P < 0.05$, indicada mediante un asterisco (*). Todos los resultados son expresados como la Media \pm la Desviación Estándar de los grupos experimentales.

4.4.3. Actividad biológica: actividad sedante y ansiolítica.

4.4.3.1. Ensayos preliminares

Con el objetivo de validar la metodología propuesta inicialmente⁽⁸⁾ (anteproyecto de trabajo de graduación) tomada del estudio realizado por Ariza en 2007; se realizaron experimentos pilotos (pruebas preliminares) con el fin de determinar la dosis efectiva de diazepam (sustancia patrón) por prueba, el número de animales necesarios por grupo experimental, los tiempos de observación, ajustes al diseño de la hoja de registro de datos y otros detalles metodológicos que implica la realización de las pruebas, así mismo fueron necesarios para determinar el disolvente a utilizar para la elaboración de las diferentes diluciones de la sustancia patrón positivo.

4.4.3.2. Sustancias de referencia:

Se utilizó diazepam como sustancia de referencia o patrón, a las dosis 0.25 y 1.0 mg/kg, vo en la evaluación de la ansiedad y en la evaluación de la actividad sedante a una dosis de 0.5 mg/Kg.

4.4.3.3. Animales experimentales

Antes de comenzar el ensayo, se eligieron al azar animales jóvenes y sanos, que después conformarían los grupos experimentales. Se utilizaron ratones NIH de ambos sexos con un peso corporal entre 20 y 25 g. Los animales se mantuvieron en las condiciones de alojamiento y alimentación adecuadas para el experimento, a una temperatura y humedad relativa de 20° C y 50-70 % respectivamente, con un ciclo luz-oscuridad 12-12 hrs (7, 9, 10, 51).

4.4.3.4. Dosis y vía de administración

Se utilizaron tres dosis de la sustancia a ensayar (100, 250 y 500 mg/Kg de peso corporal), un patrón (sustancias de referencia) y un testigo o control. (Ver Anexo N° 3). Los animales del grupo testigo y patrón fueron tratados de la misma forma que los grupos de ensayo. El volumen administrado vía oral fue 0.2 mL y vía intraperitoneal 0.4 mL (Ver Figura N° 35); este volumen es el mismo para todos los grupos. Para facilitar la administración de la sustancia de ensayo, se utilizó como vehículo agua destilada y para la administración de la sustancia patrón (diazepam), propilenglicol 80%. Una vez conformados los grupos y preparadas las dosis de la sustancia de ensayo y patrón, fueron administradas una hora antes de cada prueba a excepción de diazepam (30 minutos antes). Así mismo, el acceso al agua y la comida se suspendió 2 horas antes de cada prueba. (9)



Figura N° 35. Administración intraperitoneal de *pentobarbital* sódico en la prueba de potenciación del sueño.

4.4.3.5. Determinación de la actividad sedante

4.4.3.5.1. Sueño inducido por *Pentobarbital Sódico*

Se confeccionaron 5 grupos experimentales: control negativo (testigo), control positivo (patrón), tratamiento dosis 100 mg/Kg, tratamiento dosis 250 mg/Kg y tratamiento dosis 500 mg/Kg. Cada uno de los grupos formados por 5 ratones NIH, para ambos sexos.

Una vez formados los grupos, se les administró la sustancia en estudio, en este caso, extracto acuoso liofilizado de flores de *Erythrina berteroana* (pito); a las dosis especificadas anteriormente y una hora antes de la prueba. El grupo patrón (control positivo) fue administrado con *diazepam* 0.5 mg/Kg, 30 minutos antes de la prueba, pasados estos minutos se les administró pentobarbital sódico (50 mg/kg, ip) para inducir sueño. Al cabo de una hora a los grupos tratamiento y control negativo se les administró *pentobarbital sódico* (8, 9)

Inmediatamente se registró el tiempo que el animal tardó en perder el equilibrio (período de latencia) y el tiempo que tardó en recuperarlo (período de sueño) (Ver Figura N° 36).



Figura N° 36. Potenciación del sueño. Determinación de Actividad Sedante.

4.4.3.6. Determinación de la actividad ansiolítica

4.4.3.6.1. Enterramiento de esferas.

Se confeccionaron 5 grupos experimentales: control negativo (testigo), control positivo (patrón), tratamiento dosis 100 mg/Kg, tratamiento dosis 250 mg/Kg y tratamiento dosis 500 mg/Kg. Cada uno de los grupos formados por 10 ratones NIH, para ambos sexos.

Los ratones se colocaron individualmente en jaulas de policarbonato, con el material de cama (superficie de viruta fina de madera) por 30 minutos (período de habituación) finalizado este período se colocaron en jaulas de espera (Ver Figura N° 37).

Luego se pusieron sobre la viruta 20 esferas de vidrio espaciadas de 2 cm de distancia. Los ratones fueron reintroducidos en la misma jaula en la que fueron habituados anteriormente (Ver Figura N° 38) (30, 38).



Figura N° 37. Prueba de enterramiento de esferas. A la izquierda jaula de habituación, caja de policarbonato transparente con viruta. A la derecha período de habituación.

Después de 30 minutos, el período de enterramiento de esferas termina mediante el retiro del ratón de la jaula y se contaron aquellas canicas/esferas enterradas o cubiertas al menos en sus dos terceras partes con material de cama. (Ver Figura N° 38)

Se ha sugerido que el enterramiento de esferas de vidrio por los ratones podría constituir una prueba útil para la evaluación de la actividad ansiolítica. Este comportamiento al enterrar las esferas, se piensa que es una expresión de la actitud defensiva, o es de alguna forma, ansiedad. Los animales que escondieron mayor número de esferas presentan un mayor nivel de ansiedad.

(30, 38, 55)

En el presente estudio se utilizó un diseño utilizado por Homma *et al.* En el año 2009, el cual se inicia introduciendo individualmente en la jaula conteniendo únicamente material de cama (período de habituación), este período provee confiabilidad y validez del experimento. (30)

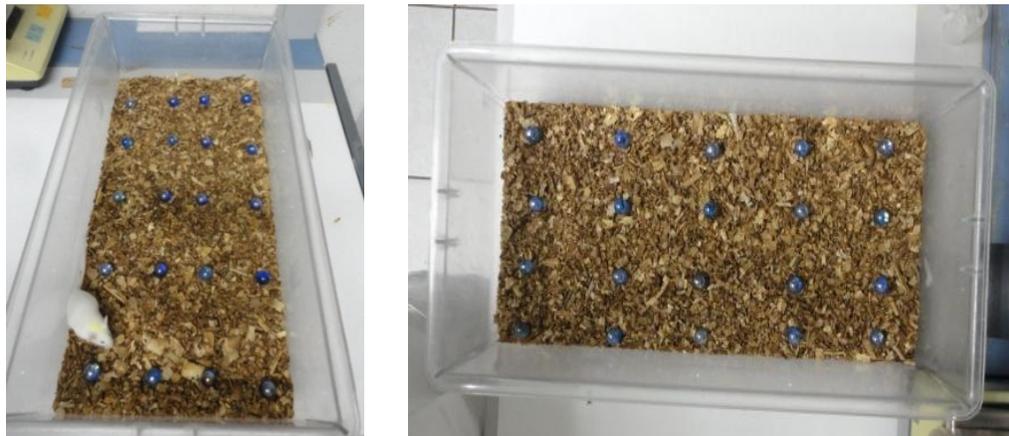


Figura N° 38. Prueba de enterramiento de esferas. Tiempo de prueba, 30 minutos.

4.4.3.6.2. Suelo agujereado.

Se confeccionaron 5 grupos experimentales: control negativo (testigo), control positivo (patrón), tratamiento dosis 100 mg/Kg, tratamiento dosis 250 mg/Kg y tratamiento dosis 500 mg/Kg. Cada uno de los grupos formados por 7 ratones NIH, para ambos sexos.

Para el ensayo se utilizó una plataforma de madera (50 x 50 cm) a una altura de 10 cm con 16 orificios de 2 cm de diámetro, equidistantes (Ver Figura N° 39 a).

El ensayo se ejecutó colocando el ratón en el centro de la plataforma agujereada y se evaluó la actividad durante 5 minutos, registrando el número de veces que el animal espía los orificios.

Se considera “espíar” cuando el ratón introduce la cabeza dentro de los agujeros hasta el nivel de las orejas (Ver Figura N° 39 b) ⁽⁵⁵⁾

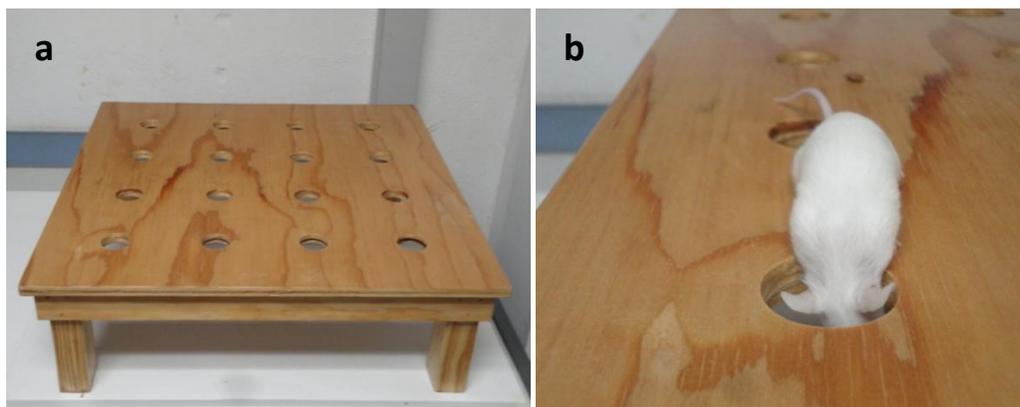


Figura N° 39. (a) Plataforma agujereada; (b) ratón explorando un orificio durante la prueba.

4.4.3.6.3. Laberinto en cruz elevado.

Se confeccionaron 5 grupos experimentales: control negativo (testigo), control positivo (patrón), tratamiento dosis 100 mg/Kg, tratamiento dosis 250 mg/Kg y tratamiento dosis 500 mg/Kg. Cada uno de los grupos formados por 7 ratones NIH, para ambos sexos.

En este método se utilizó un laberinto en forma de cruz de 30 cm de longitud, con dos extremos cerrados y dos abiertos (15 cm cada extremo), colocado con una elevación del piso de 38,5 cm. (Ver Figura N° 40). La prueba dura 5 minutos; se colocó al ratón en el centro del laberinto con dirección hacia un espacio abierto y se cuantificó el tiempo que permanece en los espacios, así como el número de entradas a cada espacio (8, 32, 39, 55).

La disminución de la actividad exploratoria es causada por miedo a los espacios abiertos y el uso de compuestos ansiolíticos incrementa esta actividad. (55).

El porcentaje de tiempo de permanencia en brazos abiertos, se calcula para cada animal de la siguiente manera:

$$\% \text{ Tiempo en Zonas Abiertas} = \frac{100 * \text{tiempo en zonas abiertas}}{\text{tiempo total de observación}}$$

El porcentaje de entradas en brazos abiertos se calcula:

$$\% \text{ Entradas a Zonas Abierta} = \frac{100 * \text{frecuencia de entradas a zonas abiertas}}{\text{TotalEntradas(zonas abiertas + zonas cerradas)}}$$

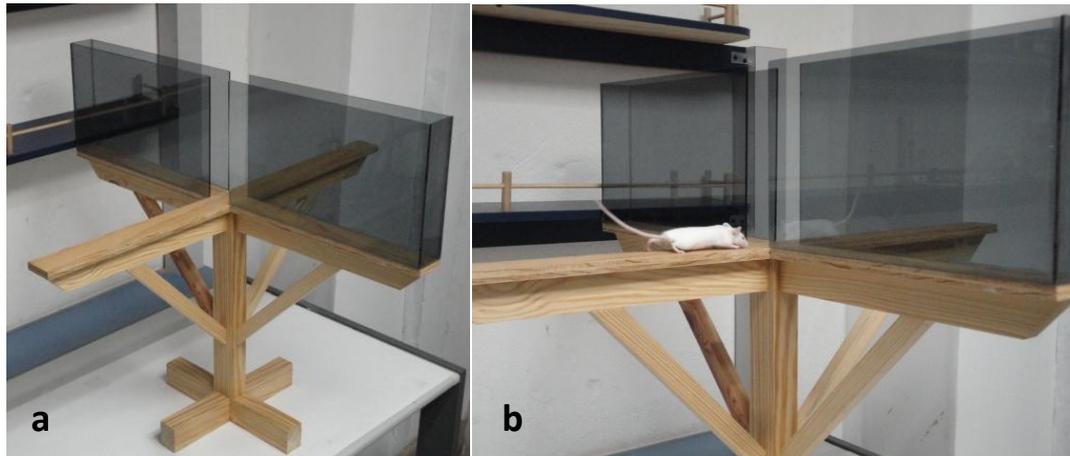


Figura N° 40. (a) Laberinto en cruz elevado; (b) ratón explorando una de las zonas abiertas del laberinto.

4.4.3.7. Análisis estadístico.

Todos los datos obtenidos en cada una de las pruebas biológicas fueron estadísticamente evaluados con el software SPSS 18.0. La prueba de hipótesis incluye el análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido de un test de Tukey para comparaciones múltiples. Se consideró que la diferencia (P) entre los grupos tratados y el grupo control positivo es significativa cuando $P < 0.05$, indicada mediante un asterisco (*). Todos los resultados son expresados como la media \pm SEM (error estándar de la media) de los grupos experimentales.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. Identificación de Alcaloides

Para la identificación de alcaloides, se trabajó con dos muestras: un producto sólido liofilizado, obtenido a partir de la liofilización del extracto acuoso (método descrito anteriormente en 4.1.1.1.); y un extracto acuoso líquido (crudo) recién obtenido de las flores de *Erythrina berteroana* (pito).

5.1.1. Pruebas químicas de precipitación:

Se realizaron tres pruebas químicas de precipitación para la identificación de los alcaloides presentes en el extracto acuoso de flores de *Erythrina berteroana* usando los reactivos de Mayer, Wagner y Dragendorff (Ver Tabla N° 5). Se identificó la presencia de estos compuestos en el extracto acuoso recién obtenido y en el extracto acuoso liofilizado (regenerado con agua destilada), en ambos se obtuvieron resultados positivos para alcaloides (Ver Figura N° 41).

Tabla N° 5. Resultados para las pruebas químicas de precipitación para la identificación de alcaloides.

MUESTRA	PRUEBA	EVIDENCIA	RESULTADO
Extracto acuoso crudo	Mayer	Precipitado blanco	Positivo
	Wagner	Precipitado marrón	Positivo
	Dragendorff	Precipitado rojo ladrillo	Positivo
Extracto acuoso liofilizado	Mayer	Precipitado blanco	Positivo
	Wagner	Precipitado marrón	Positivo
	Dragendorff	Precipitado rojo ladrillo	Positivo

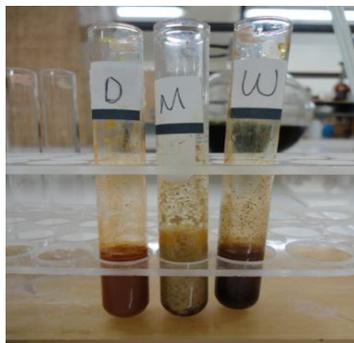


Figura N° 41. Prueba positiva para las pruebas químicas de precipitación para alcaloides. Pruebas de Dragendorff (D), Mayer (M) y Wagner (W).

Los resultados positivos para las pruebas coloreadas de precipitación nos confirman que la muestra de flores de *E. berteriana* colectada contiene alcaloides en su composición química, lo que concuerda con los datos obtenidos por Ibarra, E; y col. en 2010, quienes investigaron los alcaloides presentes en las semillas de *Erythrina americana*, encontrando en su composición alcaloides del tipo erythrinano los cuales son característicos del género *Erythrina*.⁽³¹⁾

5.1.2. Cromatografía en capa fina:

Las muestras utilizadas en la identificación de alcaloides por cromatografía en capa fina, dieron resultados positivos evidenciándose con la coloración anaranjada con el revelador de Dragendorff (Ver Figuras N° 43 y 44). Al observar la placa a la lámpara U.V. se ve la separación de compuestos como se puede apreciar en la Figura N° 42.

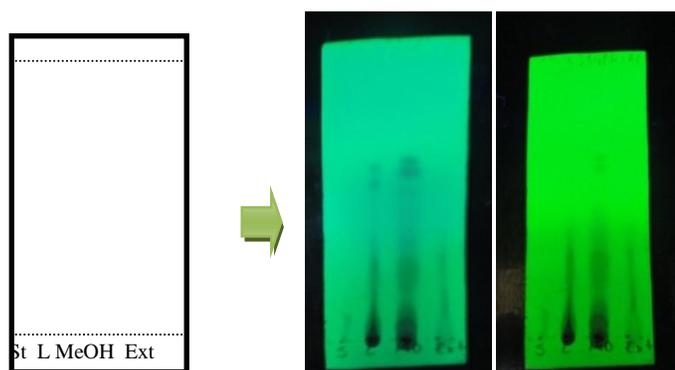


Figura N° 42. Cromatografía en capa fina, Vista en cámara con lámpara U.V. La fase móvil utilizada CHCl_3 : MeOH: Acetona. Muestras aplicadas sobre la placa: estándar, extracto acuoso liofilizado regenerado con metanol (MeOH) y extracto acuoso crudo.



Figura N° 43. Cromatografía en capa fina. Evidencia positiva (manchas anaranjadas en círculo) de la presencia de alcaloides en el extracto acuoso y en el extracto acuoso liofilizado (regenerado con agua destilada, metanol y etanol) de las flores de *Erythrina berteroana* (pito). Fase móvil utilizada CHCl_3 : MeOH: Acetona

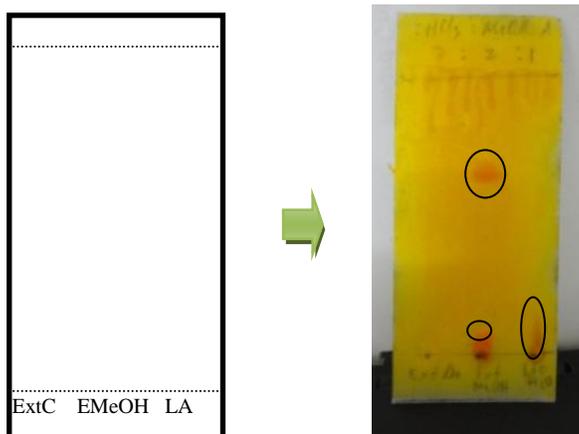


Figura N° 44. Cromatografía en capa fina. Evidencia positiva (manchas anaranjadas en círculos) de la presencia de alcaloides en el extracto acuoso liofilizado regenerado con metanol (ExMeOH) y con agua destilada (LA) de las flores de *Erythrina berteroana* (pito). Fase móvil utilizada CHCl_3 : MeOH: H_2O

La cromatografía en capa fina fue otra de las pruebas de identificación, con la cual se demostró la presencia de alcaloides tanto en el extracto acuoso liofilizado como en el extracto recién obtenido, utilizando como revelador el reactivo de Dragendorff; las muestras presentaron las manchas de color anaranjado características de la presencia de los alcaloides, siendo así una evidencia infalible de la presencia de éstos en la muestra de estudio. La fase móvil utilizada cloroformo-metanol-agua (2:7.5:0.5) nos da una idea de la clase de alcaloides presentes en esta especie; los cuales podrían encontrarse en forma de glicósidos; observándose una separación de compuestos a lámpara U.V. utilizando una fase móvil bastante polar y seguidamente los que fueron observados colorearse con el reactivo revelador.

5.2. Ensayo de toxicidad subaguda por administración continua (28 días) vía oral dosis límite de 2000 mg/kg de peso.

5.2.1. Observaciones clínicas y comportamiento del peso corporal

Durante los chequeos clínicos que se realizaron diariamente a los animales tratados con el extracto acuoso de las flores de *Erythrina berteroana* (pito), no se observaron alteraciones en los diferentes sistemas estudiados: piel, ojos y membranas mucosas, sistema respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, actividad somatomotora y patrones de comportamiento.

En la siguiente tabla se observa el comportamiento del peso corporal durante el tiempo de ensayo, en ella se puede apreciar que, todos los grupos machos y hembras, aumentaron de peso a excepción del grupo tratamiento en hembras, el cual presentó una disminución del 12.12% al finalizar el ensayo. (Ver Tabla N° 6)

En los grupos machos no hubo diferencias significativas entre la ganancia porcentual de peso corporal obtenida de los tratados y los controles, habiendo una ganancia de peso entre el 3.93% y el 6.97% para los animales tratados con el extracto en estudio. (Ver Anexo N° 4 y 5)

Considerando que normalmente después de la administración de sustancias tóxicas se producen pérdidas de peso como consecuencia de la movilización de reservas energéticas del individuo para enfrentar la actividad metabólica incrementada que acompaña los procesos de desintoxicación ⁽⁵⁶⁾, se puede decir que el comportamiento del peso corporal del grupo hembras tratamiento donde hubo una disminución porcentual, puede deberse a una baja toxicidad de la especie vegetal en estudio o un acercamiento a esta, ya que, la disminución de más del 10 % del peso corporal es considerada un indicativo de efectos

adversos a la salud, por cuanto es un indicador del estado fisiológico general del organismo (54), entonces la muestra sometida a ensayo posee una baja toxicidad aunque no existe ninguna correspondencia con otros signos de toxicidad evaluados durante las observaciones clínicas diarias.

Tabla N° 6. Variación de los valores promedios de peso corporal (g) de grupos experimentales a lo largo del ensayo y el grado de significancia (Sig. Bilateral*) de los grupos tratamiento y centinela con respecto al aumento porcentual de peso corporal correlacionado con los grupos controles.

		Peso Inicial			Peso Final				
Grupo		Media	±	Desv. E	Media	±	Desv. E	Aumento %	Sig. Bilateral
HEMBRAS	Control	20,11	±	1,633	22,25	±	1,789	10,81 ± 6,25	
	Centinela	20,27	±	1,416	20,77	±	0,511	2,62 ± 3,63	0,054
	Tratamiento	20,33	±	1,378	17,91	±	2,383	-12,12 ± 8,17	0,009*
MACHOS	Control	24,28	±	0,850	26,03	±	3,376	6,97 ± 10,29	
	Centinela	19,39	±	0,949	20,29	±	0,899	4,68 ± 1,12	0,690
	Tratamiento	26,34	±	0,462	27,38	±	0,814	3,93 ± 1,75	0,632

Los valores se expresan como la media ± desviación estándar (Desv. E); aumento porcentual y la diferencia significativa, señalada en la tabla mediante un asterisco (*); entre los grupos tratamiento y centinela respecto a sus controles cuando $P < 0,05$.

5.2.2. Examen macroscópico de los órganos

Se sacrificaron todos los animales para el examen de los órganos internos. No se reportaron alteraciones macroscópicas en cuanto a superficie, color, consistencia y tamaño de los órganos de los grupos tratamiento, estos datos fueron similares a los obtenidos de los grupos control.

De la misma manera y tal como muestra la Tabla N° 7, no se reportan diferencias significativas del peso de órganos entre los grupos tratados y los controles de ambos sexos; a excepción del aumento significativo de los valores promedios de peso de riñón en machos tratados con la sustancia en estudio con un valor de significancia de 0.003 respecto a sus controles. (Ver Anexo N° 6)

Tabla N° 7. Valores promedio de peso de órganos en gramos de los grupos control y tratamiento y el grado de significación con un intervalo de confianza de 95%.

Órgano	Grupo	HEMBRAS				MACHOS			
		Media	±	Desv. E	Sig. Bilateral	Media	±	Desv. E	Sig. Bilateral
Hígado	Control	1,032	±	0,136	0,930	1,203	±	0,239	0,124
	Tratamiento	1,024	±	0,142		1,454	±	0,040	
Corazón	Control	0,108	±	0,011	0,114	0,123	±	0,015	0,621
	Tratamiento	0,098	±	0,004		0,128	±	0,016	
Pulmón	Control	0,276	±	0,349	0,415	0,138	±	0,005	0,076
	Tratamiento	0,134	±	0,025		0,152	±	0,013	
Bazo	Control	0,210	±	0,022	0,280	0,158	±	0,048	0,577
	Tratamiento	0,182	±	0,049		0,174	±	0,037	
Riñón	Control	0,158	±	0,008	0,803	0,208	±	0,022	0,003*
	Tratamiento	0,156	±	0,015		0,266	±	0,018	
Estómago	Control	0,650	±	0,126	0,805	0,608	±	0,136	0,382
	Tratamiento	0,628	±	0,146		0,534	±	0,101	
Intestinos	Control	2,250	±	0,288	0,717	2,503	±	0,147	0,192
	Tratamiento	2,312	±	0,230		2,846	±	0,452	

Los valores se expresan con la media ± desviación estándar (Desv. E) y la significancia de la diferencia, señalada en la tabla mediante un asterisco (*): entre los grupos tratamiento y control, cuando $P < 0.05$

El aumento significativo de los valores promedios de peso de riñón en machos tratados respecto a sus controles, carece de significancia clínica por cuanto no corresponde ni a alteraciones macroscópicas en cuanto a superficie, color, consistencia y tamaño del órgano, ni alteración alguna observada en los cortes histopatológicos de ese órgano.

5.2.3. Exámenes hematológicos

En la Tabla N° 8 puede observarse los valores de significancia calculados, en los cuales no se observan diferencias significativas entre los valores promedios de los grupos tratamiento y centinela comparados con los grupos control en ambos sexos. Nótese que los valores promedios de cada parámetro hematológico de los ratones experimentales son muy afines a los de los ratones control. (Ver Anexo N° 7)

Los exámenes hematológicos son indicadores del alcance y profundidad de los efectos adversos de una sustancia ⁽²⁷⁾, en ese sentido, el aumento o disminución en los valores obtenidos de los grupos tratamiento y centinela con respecto a los grupos control (Ver Tabla N° 8) no corresponden a ningún proceso toxicológico puesto que dichas variaciones no son estadísticamente significativas y no guardan relación con ningún otro indicador evaluado.

Tabla N° 8. Valores de significancia de la diferencia entre los grupos tratamiento y centinela respecto a los grupos control, calculados a partir de los valores promedio de cada parámetro hematológico.

Parámetro	Grupo	HEMBRAS			MACHOS				
		Media	±	Desv. E	Sig. Bilateral	Media	±	Desv. E	Sig. Bilateral
Hemoglobina	Control	13,67	±	0,53		13,83	±	1,4	
	Tratamiento	14,87	±	0,99	0,066	14,25	±	0,57	0,850
	Centinela	13,53	±	0,56	0,710	14,08	±	0,74	0,893
Hematocrito	Control	41	±	1,58		41,5	±	4,2	
	Tratamiento	44,6	±	2,97	0,066	42,75	±	1,71	0,851
	Centinela	40,6	±	1,67	0,708	42,25	±	2,22	0,893
Neutrofilos %	Control	55,6	±	3,58		50,5	±	7,19	
	Tratamiento	44,6	±	12,76	0,101	42,5	±	12,37	0,397
	Centinela	49,2	±	8,44	0,157	47,5	±	5,26	0,735
Linfocitos %	Control	40,6	±	3,29		47	±	5,6	
	Tratamiento	52	±	16,12	0,160	53,75	±	17,44	0,707
	Centinela	49,4	±	9,26	0,080	45,75	±	11,67	0,715
RTE (mg/mm)	Control	61,9	±	2,82		62,25	±	6,3	
	Tratamiento	66,9	±	4,45	0,066	64,13	±	2,56	0,851
	Centinela	60,9	±	2,51	0,570	63,38	±	3,33	0,893

Los valores se expresan con la media \pm desviación estándar (Desv. E) y la significancia de la diferencia, señalada en la tabla mediante un asterisco (*); entre los grupos tratamiento y centinela respecto a sus controles cuando $P < 0.05$

5.2.4. Exámenes histopatológicos.

Evaluados los tejidos hepático y renal en cortes histológicos de 5 μ m de espesor y teñidos manualmente mediante la técnica hematoxilina-eosina y observados a los distintos aumentos (4x, 10x y 40x) se determinó que no existieron evidencias de alteraciones microscópicas excepto en un caso en hígado del grupo centinela hembras en el que se observó un discreto infiltrado inflamatorio mixto focal inespecífico no atribuible a la sustancia administrada durante el ensayo. (Ver Anexo N° 8)

Mediante la histopatología se pudieron examinar a nivel microscópico los órganos, hígado y riñón; y respecto al discreto infiltrado inflamatorio mixto focal inespecífico, encontrado en un corte histológico de hígado de una hembra centinela, este no representa un posible signo de toxicidad porque no se relaciona con ningún otro parámetro evaluado, además fue el único caso que presentó la alteración observada, la cual debe entenderse como una lesión espontánea propia del animal en cuestión y no debe ser considerado como un efecto de la sustancia administrada.

5.3. Determinación de la actividad sedante.

5.3.1. Sueño inducido por pentobarbital sódico

El período de sueño para todos los grupos fue aproximadamente de 60 minutos, a excepción del grupo control positivo (diazepam 0.5 mg/Kg de peso corporal), el cual aumentó el tiempo de sueño con una media de 131.5 minutos en hembras y 126.75 en machos. En la Figura N° 46 se puede observar que existe estadísticamente una diferencia significativa entre los grupos tratados con el extracto de ensayo y los grupos control positivo.

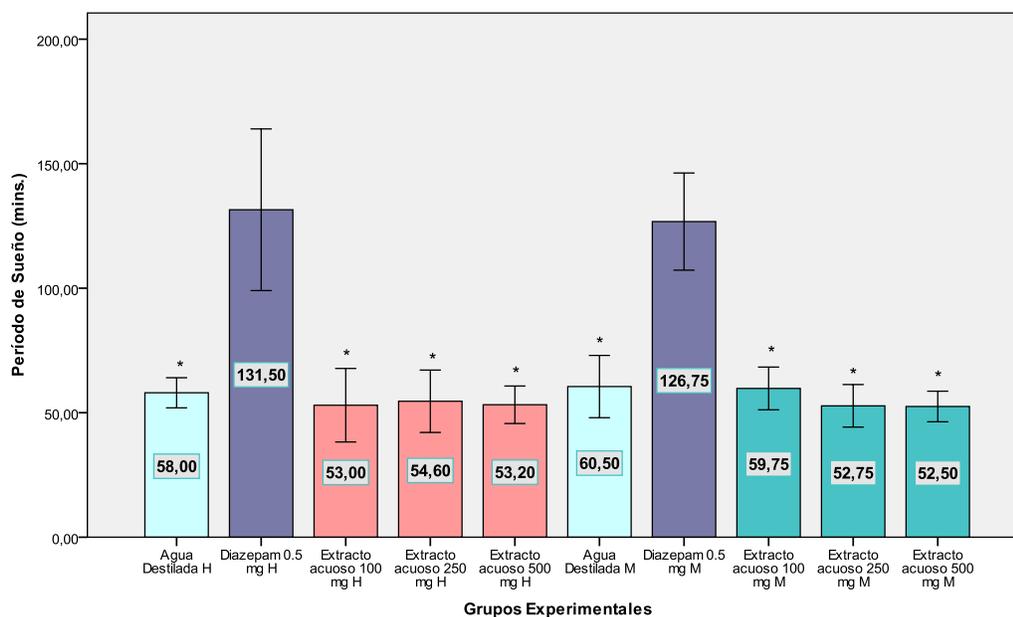


Figura N° 45. Período de sueño. Comparación entre los grupos controles (agua destilada y diazepam) y los grupos tratamiento a dosis 100, 250 y 500 mg/Kg para hembras (H) y machos (M). Los datos se expresan como la media \pm SEM; se consideró que la diferencia entre los grupos tratados y el grupo control positivo es significativa (*) cuando $P < 0,05$. ANOVA/ Tukey-Kramer.

El sueño inducido por pentobarbital sódico es una de las pruebas de sedación que permite medir la influencia de los medicamentos o plantas medicinales sobre la duración del sueño inducida por un hipnótico. Durante la prueba se observó en los animales administrados con la sustancia de ensayo un efecto antagónico en el adormecimiento del ratón (Ver figura N° 45) ya que no aumenta el tiempo de sueño, sino que por el contrario, lo disminuye. Esto puede atribuirse a una posible incompatibilidad entre el pentobarbital sódico (fármaco hipnótico utilizado) y los compuestos químicos presentes en la especie vegetal. Sin embargo, no se puede dilucidar exactamente cuál es la asociación que realiza el efecto desfavorable. ⁽³⁾

Es probable que el efecto farmacológico negativo observado pueda deberse a un sinergismo entre sustancias con polaridades diferentes, ya que al someter el extracto a procesos como el de liofilización, éste podría perder o modificar los compuestos responsables de dicha actividad, o bien se deba a que esta propiedad farmacológica de las flores se ejerce a dosis más elevadas. Hasta la fecha no existe ninguna prueba farmacológica que justifique su uso popular.

5.3.2. Determinación de la actividad ansiolítica

5.3.2.1. Enterramiento de esferas

Como se puede apreciar en la siguiente gráfica (Figura N° 46) las medias para los grupos administrados con diazepam 1.0 mg/Kg fueron de 3.00 en hembras y 2.11 en machos, mientras que para los grupos control negativo (agua destilada) los valores fueron de 14.20 y 13.25, respectivamente.

Los grupos tratamiento hembras a las dosis 100, 250 y 500 mg/Kg del extracto de ensayo, respondieron con valores promedios de 15.7, 9.8 y 10.2 respectivamente; los resultados en los grupos de machos tratados a las mismas dosis, fueron 9.8, 9.4 y 8.2. La gráfica a continuación muestra sin excepción alguna diferencia estadísticamente significativa entre los valores promedios de los grupos tratamiento y sus controles positivos. La misma gráfica muestra una disminución en el número de esferas ocultas a medida la dosis tratamientos aumenta en ambos sexos

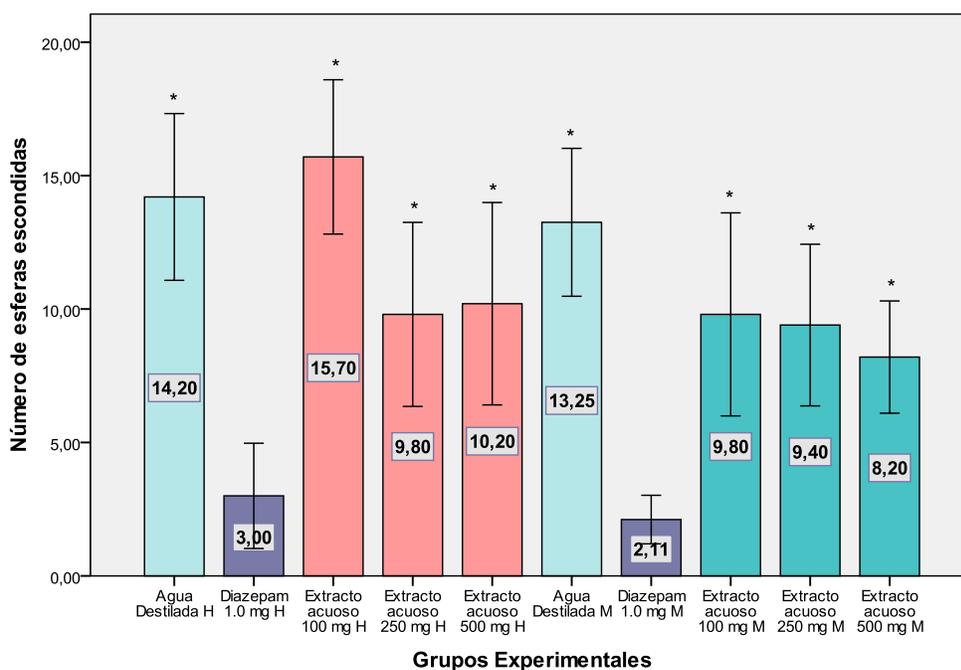


Figura N° 46. Enterramiento de esferas. Comparación entre los grupos controles (agua destilada y diazepam) y los grupos tratamiento a dosis 100, 250 y 500 mg/Kg para hembras (H) y machos (M). Los datos se expresan como la media \pm SEM; se consideró que la diferencia entre los grupos tratados y el grupo control positivo es significativa (*) cuando $P < 0,05$. ANOVA/ Tukey-Kramer.

Según los resultados obtenidos para el extracto acuoso liofilizado de las flores de *E. berteriana*, esta sustancia a dosis altas se aproxima a los resultados de la sustancia patrón o control positivo, diazepam. En el ensayo se evaluaron 3 dosis de dicho extracto, las cuales a pesar de la existencia de una diferencia estadísticamente significativa respecto a sus controles positivos, se puede observar en la Figura N° 46, que los valores promedios de la cantidad de esferas enterradas se reduce conforme aumenta la dosis de la sustancia de ensayo y por consiguiente los resultados no descartan totalmente las propiedades ansiolíticas por parte del extracto en estudio ya que el comportamiento observado en los animales tratados es diferente a los animales administrados con agua destilada (control negativo), lo que podría indicar que el temor natural del animal a las esferas como agente de estrés ⁽⁵⁵⁾ disminuya a medida aumenta la concentración del extracto de ensayo, por lo que estaríamos frente a un efecto ansiolítico.

5.3.2.2. Suelo agujereado.

Durante esta prueba se pudo observar, en cuanto al número de exploraciones, que los grupos formados por hembra presentaron una mayor actividad exploratoria, aumentando dicho número según va aumentando la dosis del extracto en estudio.

Los valores promedios para los grupos de hembras tratados con el extracto, oscilan entre los 30.57 y 36.43; mientras que en los grupos machos tratamiento, se vio una disminución en la exploración, obteniéndose valores entre los 10.29 y 22.29; tal como se puede ver en la Figura N° 47. También se puede apreciar la diferencia de medias entre los grupos control negativo, en donde en hembras se obtuvo el 26.50, mientras que en machos se obtuvo un valor promedio de 9; de igual manera puede apreciarse que existe una diferencia significativa entre

los grupo control negativo y los grupos tratamiento, a excepción con el grupo tratado con una dosis de 500 mg/Kg en machos.

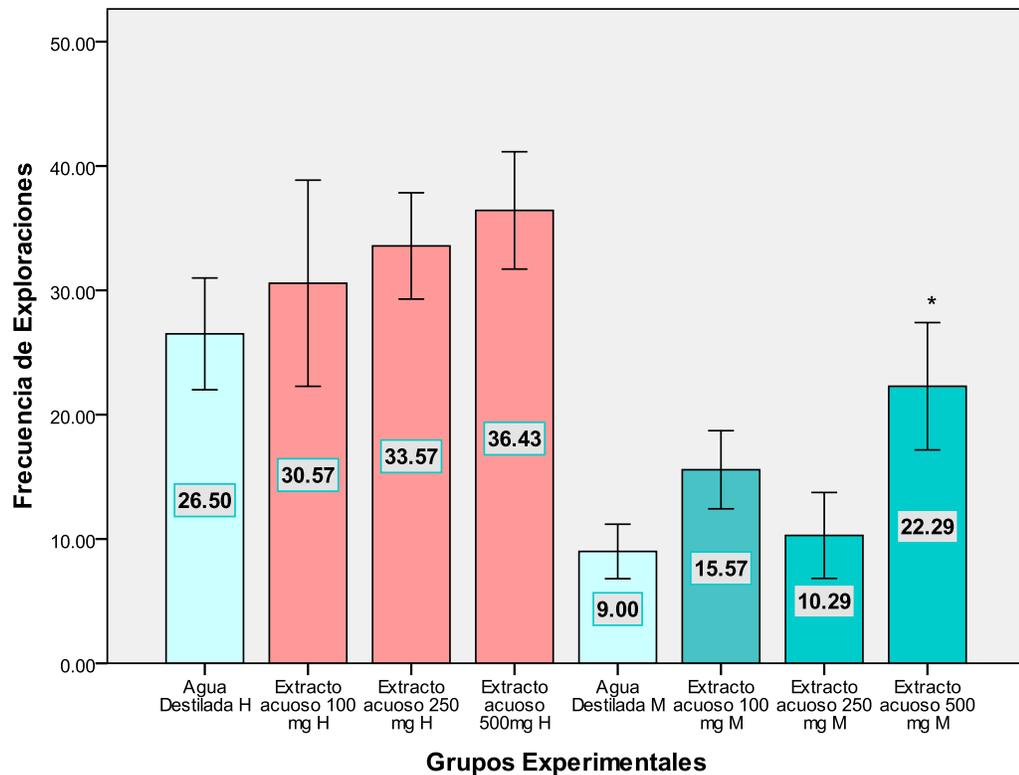


Figura N° 47. Suelo agujereado. Comparación entre los grupos controles (agua destilada) y los grupos tratamiento a dosis 100, 250 y 500 mg/Kg para hembras (H) y machos (M). Los datos se expresan como la media \pm SEM; se consideró que la diferencia entre los grupos tratados y el grupo control positivo es significativa (*) cuando $P < 0,05$. ANOVA/ Tukey-Kramer

Como se puede observar en la gráfica anterior, en el suelo agujereado el número de exploraciones guarda una relación inversa con el estado de ansiedad del animal; los compuestos ansiolíticos incrementan de manera dependiente de la dosis, el número y la duración de las espiadas a los orificios. (55). Para el presente estudio, el número de exploraciones aumentó según la dosis de la sustancia de ensayo respecto a su grupo control negativo (Ver Figura N° 47), lo que indica una tendencia a las propiedades ansiolíticas del extracto acuoso de la especie.

Además durante la prueba, a parte de este comportamiento, se ve aumentado el número de cruces, exploraciones en zonas externas (orillas de la plataforma) y la caminata del ratón de manera desinhibida; esta conducta la presentaron todos los animales experimentales tratados con el extracto de ensayo, comportamiento que los grupos administrados con agua destilada (control negativo) no presentaron. Por lo que nuevamente nos encontramos frente a un efecto ansiolítico por cuanto la conducta normal de temor a lo desconocido y a los espacios abiertos es sustituida por una conducta desinhibida. (55).

5.3.2.3. Laberinto en cruz elevado.

En esta prueba se evaluó el número de entradas a las zonas abiertas y el tiempo de permanencia en estas zonas; más adelante en la representación Figura N° 48, se ven reflejados los valores promedios obtenidos para el porcentaje de entradas a las zonas abiertas para todos los grupos experimentales, en donde se ve que el extracto de estudio hizo un mayor efecto sobre los grupos conformados por hembras para el cual el promedio osciló entre el 3.63 y 5.16 %; por el contrario los machos tratamiento no entraron a las zonas abiertas durante la prueba, lo que corresponde a un 0%, al igual que los grupos control negativo para ambos sexos.

Los valores promedios obtenidos para los grupos administrados con la sustancia patrón (control positivo) en machos y hembras fueron 21.62 y 14.47%, respectivamente. Asimismo se observa que entre los grupos tratamiento machos y su control positivo existe estadísticamente una diferencia significativa, más no así entre los grupos tratamiento y su control positivo en hembras (Ver Figura N° 48).

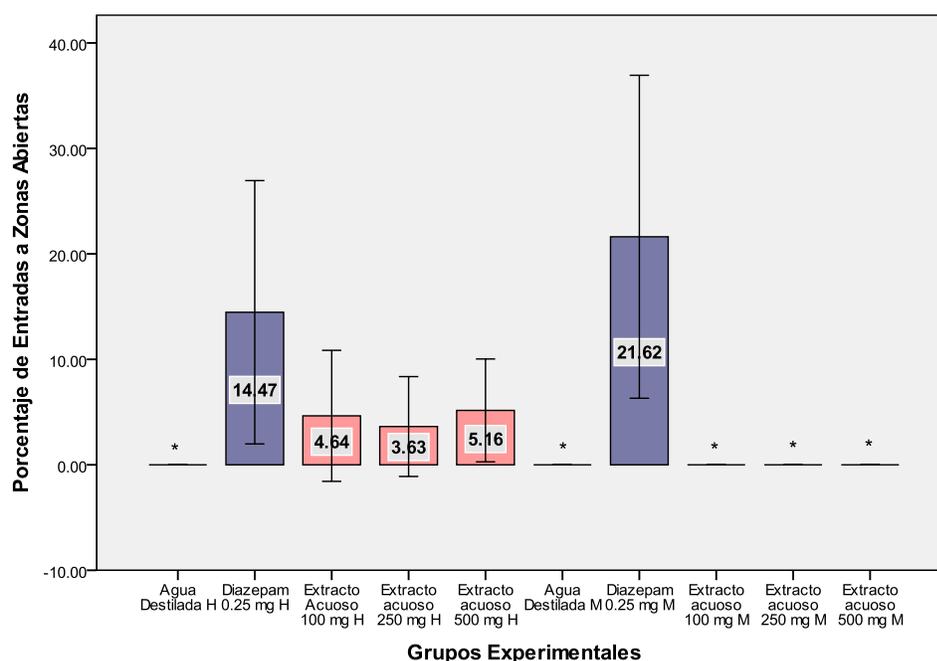


Figura N° 48. Laberinto en cruz elevado. Porcentaje de entradas a zonas abiertas. Comparación entre los grupos controles (agua destilada y diazepam) y los grupos tratamiento a dosis 100, 250 y 500 mg/Kg para hembras (H) y machos (M). Los datos se expresan como la media \pm SEM; se consideró que la diferencia entre los grupos tratados y el grupo control positivo es significativa (*) cuando $P < 0,05$. ANOVA/ Tukey-Kramer.

Conjuntamente se tomó el tiempo de permanencia en las zonas abiertas, resultados que pueden ser observados en la Figura N° 49 y en donde puede verse que los grupos hembras tratadas con el extracto de estudio, presentaron un porcentaje que oscila entre 1.35 y el 3.24%; mientras que para su grupo control positivo el promedio es del 6.99%. Respecto al tiempo gastado por los grupos machos, como se puede observar en la misma gráfica, para todos los grupos fue de 0%, a excepción del grupo control positivo para el cual se obtuvo el 7.96%.

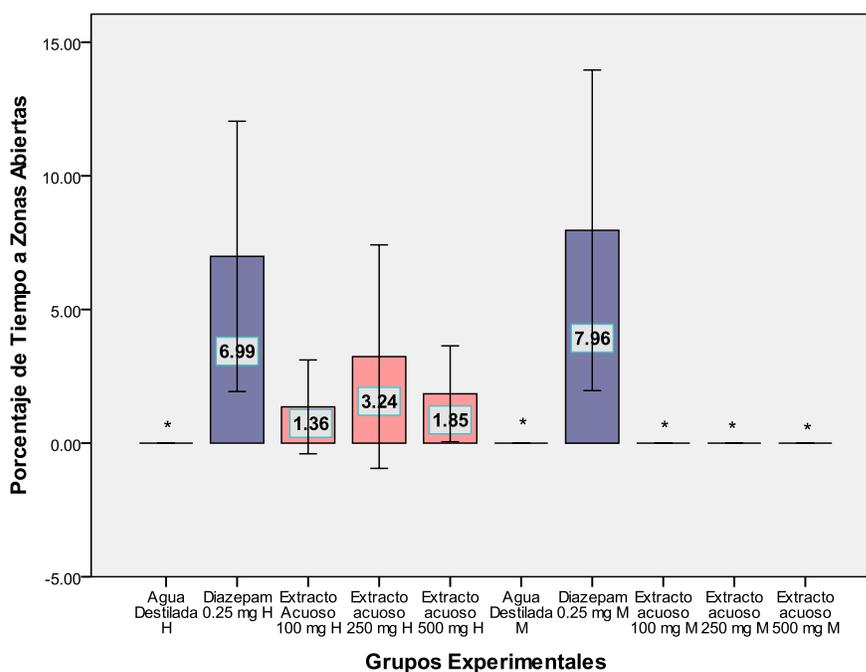


Figura N° 49. Laberinto en cruz elevado. Porcentaje de tiempo en zonas abiertas. Comparación entre los grupos controles (agua destilada y diazepam) y los grupos tratamiento a dosis 100, 250 y 500 mg/Kg para hembras (H) y machos (M). Los datos se expresan como media \pm SEM; se consideró que la diferencia entre los grupos tratados y el grupo control positivo es significativa (*) cuando $P < 0,05$. ANOVA/ Tukey-Kramer

La prueba se basa en respuestas espontáneas de la conducta del ratón, utilizando estímulos naturales, miedo a los espacios abiertos y miedo de caminar sobre una plataforma elevada y relativamente estrecha, que inducen ansiedad también en los humanos. (55)

La conducta descrita anteriormente se manifestó en los ratones en estado normal, es decir que, la presentaron los animales administrados con agua destilada (control negativo) en ambos sexos y contrario a lo esperado, también se observó en los machos administrados con la sustancia de ensayo, mientras que en los grupos hembras no fue así.

Los resultados para esta prueba ponen nuevamente de manifiesto para la sustancia en ensayo, la posible actividad ansiolítica, puesto que provoca un aumento en los efectos según aumenta la dosis, observándose este efecto en hembras (Ver Figuras N° 48 y 49), pues se observó una conducta menos temerosa a las alturas y a los espacios abiertos. Estos resultados indican, por otro lado que, las hembras son más susceptibles a la sustancia de estudio. A pesar de esto, los machos al igual que las hembras, mostraron un aumento en la actividad motora, en comparación con los grupos control negativo, evidenciándose con el número de entradas a zonas cerradas, dicho aumento es característico de las sustancias ansiolíticas (39), comprobándose que la sustancia de ensayo administrada aumenta esta actividad, observada también en los grupos administrados con diazepam.

Los estudios experimentales con animales presentan resultados contradictorios apareciendo machos o hembras como los más afectados dependiendo del tipo concreto de conducta considerada. Sobre los posibles mecanismos de estas diferencias de género en la respuesta a los neurolépticos, se señala el papel protector de los estrógenos sobre el sistema dopaminérgico. (2)

Recientes investigaciones han relacionado las hormonas sexuales con los efectos de las benzodiazepinas al modificar el complejo GABA-benzodiazepínico; así, se considera que el estradiol está asociado a un efecto excitatorio neuronal y la progesterona a una inhibición, por lo que esta última hormona podría potenciar los efectos de los neurolepticos, lo que haría que el género femenino fuese más sensible a los efectos ansiolíticos que los machos.

(2)

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- 1 Se demostró la presencia de alcaloides mediante los resultados obtenidos en las pruebas de identificación, tanto en las químicas de precipitación como en cromatografía en capa fina, en esta última se observaron las manchas características de los alcaloides usando como fase móvil cloroformo-metanol-agua (2:7.5:0.5), por lo cual se afirma que están presentes estos compuestos químicos nitrogenados en el extracto acuoso de flores de *Erythrina berteroana* (pito).
- 2 De acuerdo a los resultados de cero mortalidad observados durante el ensayo de toxicidad subaguda oral a dosis repetidas de 28 días y según la clasificación de sustancias tóxicas de la OECD en su Guideline for Testing of Chemical N° 423, el extracto acuoso liofilizado de flores de *Erythrina berteroana* (pito) utilizado en el presente trabajo, se clasifica dentro de la categoría N° 5 ya que posee una CL₅₀ mayor de 2000 mg/Kg, en cuanto que no representa alteraciones serias en el estado de salud general de los animales experimentales en los parámetros evaluados.
- 3 Según los efectos observados durante la prueba de sueño inducido con *pentobarbital sódico*, y dado que el tiempo de duración de sueño para los grupos tratados con dicho extracto, el cual es similar al tiempo de sueño del control negativo utilizado, y habiendo una diferencia significativa respecto al patrón, *diazepam* 0.5 mg/Kg, se concluye que el extracto

acuoso liofilizado de las flores de *Erythrina berteroana* (pito) utilizado en el presente estudio, no posee propiedades sedantes.

- 4 Después de la investigación y análisis de los resultados en las pruebas para la evaluación de la actividad ansiolítica, se puede afirmar que el extracto acuoso evaluado de la especie de ensayo, a las dosis ensayadas, posee propiedades ansiolíticas dando respuestas levemente efectivas durante la evaluación en las distintas pruebas, observándose que el rendimiento efectivo se ve aumentado conforme aumenta la dosis administrada.
- 5 Durante las pruebas para la determinación de la actividad ansiolítica se observó que los grupos conformados por hembras fueron más sensibles al extracto acuoso de *Erythrina berteroana* (pito), esta respuesta es característica de las hembras sometidas a tratamiento con neurolépticos debido al supuesto papel protector de los estrógenos sobre el sistema dopaminérgico, lo anterior indica que el extracto acuoso ensayado, posee propiedades neurofarmacológicas que se ven evidenciadas en los resultados obtenidos en las pruebas de suelo agujereado y laberinto en cruz elevado.
- 6 Dada la efectividad en las distintas pruebas de actividad ansiolítica y la evidencia positiva de los alcaloides en las pruebas de identificación realizadas, se podría decir que, al igual que en estudios anteriores sobre la composición química del género *Erythrina*, los compuestos responsables de dicha actividad farmacológica son los alcaloides presentes en el extracto acuoso de *Erythrina berteroana* (pito).

- 7 Dados los resultados obtenidos, el extracto acuoso de la especie en estudio a las dosis ensayadas, posee propiedades neurofarmacológicas, por lo tanto es necesario someter nuevamente a dicha especie vegetal a investigación, ya que el presente trabajo es un estudio preliminar de la especie ***Erythrina berteroana*** (pito) y los resultados en modelos animales son únicamente la primera fase (preclínica) para determinar la eficacia en humanos. Los datos obtenidos en este estudio son parte de la información que se necesita para avanzar a la siguiente fase (clínica), por lo cual no es concluyente para su uso seguro, pues los efectos secundarios que puedan presentarse deben monitorearse cuidadosamente

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

7. RECOMENDACIONES

1. Tomar las precauciones necesarias en la utilización de preparados caseros de *Erythrina berteroana* con fines terapéuticos, con especial atención a la administración de dichos preparados a niños, ya que el presente trabajo es una investigación preliminar de las propiedades toxicológicas y farmacológicas de *Erythrina berteroana*.
2. Aislar, elucidar y cuantificar los alcaloides del tipo erythrinano presentes en el extracto acuoso de *Erythrina berteroana*, mediante cromatografía líquida en fase reversa, RMN y espectrometría de masas y así poder determinar con certeza la presencia de dichos compuestos nitrogenados ya que estos podrían encontrarse en forma de glicósidos a los que se les atribuye la actividad farmacológica.
3. Realizar pruebas de bioquímica sanguínea y evaluar histopatológicamente los demás órganos aún no estudiados, dado que los exámenes bioquímicos determinan el buen funcionamiento del organismo y son complementarios a los exámenes histopatológicos; es por esto la importancia de someter nuevamente a investigación la especie ensayada.
4. Continuar el estudio de las propiedades ansiolíticas y sedantes de *Erythrina berteroana* (pito), en base a los resultados obtenidos en la presente investigación, respaldándose con otras pruebas para la medición de la ansiedad, tales como campo abierto, prueba de caja

luz/oscuridad y la de choque/enterramiento; dado que para el extracto acuoso ensayado, estadísticamente los valores se aproximan a una respuesta efectiva, para lo cual se debe aumentar las capacidades técnicas y modificar las condiciones físicas de laboratorio y equipamiento adecuado para la ejecución de dichas pruebas, con el fin de descartar todo tipo de interferencias para constatar dichas propiedades atribuidas a esta especie popularmente utilizada.

5. Repetir este tipo de investigación usando muestras de esta especie provenientes de otras zonas geográficas, obteniendo extractos con diferentes solventes, tomando en cuenta que dependiendo la zona podrían contener proporciones diferentes de su perfil químico y por tanto una mayor actividad neurofarmacológica.
6. Utilizar la cepa de ratón SAM, la cual es una cepa especial de laboratorio para evaluar propiedades ansiolíticas, además someter a los animales a una prueba basal (suelo agujereado) para su clasificación, de modo que todos los animales experimentales tengan el mismo nivel de ansiedad o estén dentro de un rango similar.
7. Establecer asociaciones con instituciones, como el Hospital Nacional Rosales, que posee equipos especializados para la realización de las pruebas bioquímicas sanguíneas, lo que permite obtener resultados de mayor exactitud utilizando cantidades mínimas de suero, por lo que se recomienda además la colaboración de profesionales externos, lo cual sería de gran beneficio para futuras investigaciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arango Acosta G.; Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia, Noviembre de 2002. [Acceso el 08 de abril de 2011]. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/alcaloides.pdf>
2. Arenas M. C., Parra A. y Simón V. M., Diferencias de género en los efectos del haloperidol y otros neurolépticos. *Psicothema*, 7(2), 327-338. 1995.
3. Barrios Valenzuela, A. Validación farmacológica de la acción sedante e hipnótica de rizoma de *Valeriana prionophylla* (valeriana) en combinación con hojas de *Passiflora edulis* (flor de la pasión), flor con bráctea de *Tilia platyphyllos* (tilo) o pericarpio de *Citrus aurantium* (naranja agria) en infusión [Trabajo de Graduación] Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 2007.
4. Bruneton, J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia: Alcaloides. Zaragoza, España: Editorial ACRIBIA, S. A; 1991. p. 355-366.
5. Cañas Montiel, R.; López Paredes, M.; “Determinación de la Bioactividad Citotóxica de Extractos de Veintiséis Especies Vegetales Mediante el Ensayo Simple con *Artemia salina*” [Trabajo de Graduación], San Salvador, El Salvador. Universidad de El Salvador, 2001.

6. Cardozo, C. y otros. El animal como sujeto experimental. Aspectos Técnicos y Éticos. Centro Disciplinario de Estudios en Bioética (CIEB), Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, Universidad de Chile, 2007. p. 13-14
7. CCAC. Consejo Canadiense para el Cuidado Animal. Manual sobre el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación, 1998.
8. Centro de Investigación y Desarrollo en Salud. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Efectos Farmacológicos sobre el sistema nervioso central. Universidad de El Salvador: CENSALUD, 2010.
9. Centro de Investigación y Desarrollo en Salud. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Vías de administración y toma de muestras (rata y ratón). Universidad de El Salvador: CENSALUD, 2010.
10. Centro de Investigación y Desarrollo en Salud. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Toxicidad Subaguda por administración continua a 28 días. Universidad de El Salvador: CENSALUD, 2010.
11. Chawla, A.S., Jackson A.H., Ludgate Peter. *Erythrina* Alkaloids. Part 6. Isolation and Characterisation of alkaloids from ***Erythrina berteroana*** Seeds and Leaves: formation of Oxoerythroidines. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 1982. 2903-2907.
12. Chawla, A.S., y Jackson A.H. *Erythrina* and Related Alkaloids. Revisión de la literatura publicada entre julio 1982 y junio 1983, (*Revisión de The Alkaloids* Vol. 13, p. 196). *Natural Product Reports* 1984. 371-373.

13. Chawla, A.S., y Jackson A.H. *Erythrina* and Related Alkaloids. Revisión de la literatura publicada entre julio 1983 y junio 1985, (continuando con la cobertura de la literatura de *Natural Product Reports*, 1984, Vol. 1, p. 371). *Natural Product Reports*, 1986. 555-564.
14. Chawla A.S., y Jackson A.H. *Erythrina* and Related Alkaloids. Revisión de la literatura publicada entre julio 1985 y junio 1987, (continuando con la cobertura de la literatura de *Natural Product Reports*, 1986, Vol. 3, p. 555). *Natural Product Reports*, 1989. 55-66.
15. Chawla A.S., y Jackson A.H. *Erythrina* and Related Alkaloids. Revisión de la literatura publicada entre julio 1987 y junio 1989, (continuando con la cobertura de la literatura de *Natural Product Reports*, 1986, Vol. 6, p. 55). *Natural Product Reports*, 1990. 565-575.
16. Chízmar Fernández, C. Plantas comestibles de Centroamérica, Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: INbio, Instituto Nacional de Biodiversidad; 2009.
17. Coloma Ramírez, J., Evaluación “in vitro” de la actividad antifúngica de los alcaloides del agua de cocción del proceso de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) [Tesis Postgrado] Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia; 2009.
18. Dantas, M.C; De Oliveira, F. S., Bandeira, S. M; Batista, J. S.; Silva, C. D., Alves P. B., Antonioli, A.R., *et al.* Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004. (94)129-133.

19. Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach. 3^a ed. Gran Bretaña, Chippenham, Wiltshire: Jonh Wiley and Sons Ltd.; 2009. p. 311.
20. File S.E, Pellos S. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. *Brit J Pharmacol.* 1985; 86 (3):729-735.
21. Flausino, O.; Pereira, A; Vanderlan da Silva, B.; y Nunes-de-Souza, R. Effects of Erythrinian Alkaloids Isolated from ***Erythrina mulungu***(Papilionaceae) in Mice Submitted to Animal Models of Anxiety. *Biological&PharmaceuticalBulletin.* 2007. 30(2) 375-378.
22. Flausino, O.; Luciana de Ávila Santos, Verli, H.; Pereira, A.; Vanderlan da Silva B., y Nunes-de-Souza, R.; Anxiolytic Effects of Erythrinian Alkaloids from ***Erythrina mulungu***, *Journal of Natural Products*, 2007, 70(1): 48-53.
23. Fuentes Paredes y otros. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón; Centro Nacional de Productos Biológicos, Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud del Perú, Lima, Perú, 2008.
24. Garín-Aguilar, Ma. Eugenia; Ramírez Luna, J; Soto-Hernández, M; Valencia del Toro, G; y Martínez Vázquez, M. Effect of crude extracts of ***Erythrina americana Mill.*** on aggressive behavior in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000. (69)189-196.

25. García-Mateos, M. R.; Soto-Hernández, R. M.; Gutiérrez, R. J. M.; Villegas-Monter, A. ALKALOIDS FROM SEVERAL SUBCULTURES OF ***Erythrina americana* Miller** CALLUSES. Chapingo. Universidad Autónoma de Chapingo, Mexico, 2005. Serie horticultura, 11(1): 21-26.
26. Gonzales Ayala, J.; Botánica Medicinal Popular. Etnobotánica Medicinal de El Salvador: CUSCATLANIA, Publicación ocasional del Jardín Botánico La Laguna, El Salvador, Centroamérica, 2002. p. 68, 88, 90, 96, 100-102, 114, 165.
27. González Y., Scull I., Bada A., *et al.* Ensayo de toxicidad a dosis repetidas durante 28 días del extracto acuoso de ***Cecropia peltata* L.** (yagruma) en ratas Cerp: SPRD. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 2006, 11(2).
28. Guerrero, M., Obtención y Aprovechamiento de extractos vegetales de la flora salvadoreña. Vol 1. El Salvador: PLANTER, 1989.
29. Hitoshi T; Hisanori, H; *et al.* A new ***Erythrina*** alkaloid from ***Erythrina herbacea***. *Journal of Natural Medicines*, 2008. 62: 228-231.
30. Homma and Kazuyuki, "Physical Properties of Bedding Materials Determine the Marble Burying Behavior of Mice (C57BL/6J)", *The Open Behavioral Science Journal*, 2009, 3, 34-39.
31. Ibarra Estrada, E.; Actividad Antioxidante de Alcaloides de ***Erythrina americana* Miller**. [Tesis Postgrado], Colegio de Postgraduados: Institución de enseñanza e investigación en Ciencias Agrícolas, Montecillo, México, 2010.

32. I.M. Raupp; A. Sereniki; S. Virtuoso; C. Ghislandi; E.L. Cavalcanti e Silva; H.A. Trebien; O.G. Miguel; *et al.* Anxiolytic-like effect of chronic treatment with ***Erythrina velutina*** extract in the elevated plus-maze test. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008. (118) 295-299.
33. Instituto Nacional de la Salud Mental. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos. Trastornos de Ansiedad. Instituto Nacional de la Salud Mental, 2009.
34. Jiménez G. A., y Díaz M., El insomnio en la práctica médica. Revista de la Facultad de Medicina UNAM, 2000. 43(2): 46-48.
35. José L. Del medicamento natural al medicamento de síntesis [Internet] España: Instituto de Historia de la Medicina y de la Ciencia, Universidad de Valencia; 2011 [Acceso 14 mayo de 2011]. Disponible en: <http://www.historiadelamedicina.org/farmab.html>
36. Kuklinski, C.; Farmacognosia: Alcaloides. Barcelona, España: Ediciones Omega, S.A; 2003. p. 167-179.
37. Kuklinski, C.; Farmacognosia: Métodos Generales de Obtención de los principios activos. Barcelona, España: Ediciones Omega, S.A; 2003. p. 32-41.
38. 'K. Njung'e& S.L. Handley; Effects of 5-HT uptake inhibitors, agonists and antagonists on the burying of harmless objects by mice; a putative test for anxiolytic agents, Br. J. Pharmacol. (1991), 104, 105-112.

39. Lalonde, R. Strazielle, C. "Relations between open-field, elevated plus-maze, and emergence tests in C57BL/6J and BALB/c mice injected with GABA- and 5HT-anxiolytic agents". *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2010. 365-376.
40. Lister R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther.* 1990; 46(3):321-40.
41. Lock, O. *Investigación Fitoquímica*. 2ª Ed. España. Pontificia Universidad Católica del Perú. 1994. Pág. 264-265; 278-279.
42. Lollato, G.; Scarminio, IS., y Moreira, EG. Behavioral effects of aqueous and dichloromethane extracts of *Erythrina speciosa Andrews*, Fabaceae, leaves in mice. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2010.
43. Mejía Valencia, J.; Parada Palacios, E.; "Estudio Toxicológico subcrónico en ratones (INH) por administración oral de infusión de epazote (*Chenopodium ambrosioides*)" [Trabajo de Graduación], San Salvador, El Salvador, 2009.
44. Millar, L. C. And Tainter, M.L.: Estimation of de ED50 and its error by means of logarithmic-probit graph paper. *Proc. Soc. Exp. Biol*, 57, (1994), 261-264.
45. Missouri Botanical Garden [Base de datos en internet] Saint Louis, Missouri : 2010. [Actualizada el 11 junio de 2010, acceso 10 abril de 2011] Disponible en :
<http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=13009248&tab=distribution>

46. Missouri Botanical Garden [Base de datos en internet] Saint Louis, Missouri : 2010. [Actualizada el 11 junio de 2010, acceso 29 de junio de 2011] Disponible en :
<http://tropicos.org/PhenologyCharts.aspx?nameid=13009248>
47. Navarro, C. Coordinador. Plantas Medicinales para el Insomnio. Editorial Complutense, S. A. Madrid: El Centro de Investigación sobre Fitoterapia (INFITO); 2008.
48. Ozawa, M; Kawamata, S; Etoh, T; Hayashi, M; Komiyama, K; Kishida, A; *et al* Structures of New Erythrinan Alkaloids and Nitric Oxide Production Inhibitors from *Erythrina crista-galli*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2010. 58(8)1119-1122.
49. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Acute Oral Toxicity – Acute Toxicity Class Method. 2001.
50. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. 2001.
51. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodent. 1995.
52. Pardo, A; Ética de la Experimentación Animal. Directrices Legales y Éticas Contemporáneas; Departamento de Humanidades Biomédicas, Universidad de Navarra, España, 2005. 16 (3) 393-417.

53. Pino Rodríguez, S; Prieto González, S; Pérez Rodríguez, M; y Molina Torres, J. Género *Erythrina*:Fuente de Metabolitos Secundarios con Actividad Biológica.*Acta Farmacéutica Bonaerense*, 2004,23 (2): 252-258.
54. Ramesh T., Lee K., y Kim S.; Acute oral toxicity study of *Asiasari radix* extract in mice. *International Journal of Toxicology*, (26) 247-251.
55. Rejón- Orantes, J.; Placer Perdomo, D.; Roldan, G.; Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas, [ARTICULO DE REVISIÓN], Univ. Méd. Bogotá (Colombia), 52 (1): 78-89, enero-marzo, 2011.
56. Rodríguez, S. *et al* Toxicología de VA-DIFTET por aplicación a dosis única en ratones. *Revista de Toxicología*. 1998. (15)59-63
57. Salguero Santos, R; Valencia Aguilar, C; y Vásquez Acevedo, ME. Estudio Etnobotánico de Plantas Medicinales en el Municipio de Santo Tomás [Trabajo de Graduación], Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador, 1994.
58. Sarrais F, P. de Castro Manglano; El Insomnio An. Sist. Sanit. Navar [Revista en internet] 2007; 30 (Supl. 1): 121-134. [Acceso 20 abril de 2011]. Disponible en:
<http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol30/sup1/PDFs/10-Insomnio.pdf>

59. Shiroh I, Nobuyuki Yi, y Makoto K.; Chymotrypsin Inhibitor from ***Erythrina variegata*** Seeds: Involvement of Amino Acid Residues within the Primary Binding Loop in Potent Inhibitory Activity toward Chymotrypsin. *Journal of Biochemistry*, 1998. (124) 663-669.
60. Teixeira-Silva, F. *et al.* Benzodiazepine-Like Effects of the Alcohol Extract from ***Erythrina velutina*** Leaves: Memory, Anxiety, and Epilepsy. *Pharmaceutical Biology*, 2008. 46(5), 321–328.
61. Thitima R, Amporn S, Chatchana T, Sudarut W, y Apichart S.; Biological Activities of the Chemical Constituents of ***Erythrina stricta*** and ***Erythrina subumbrans*** *Archives of Pharmacological Research*, 2007. 30(11) 1398-1403.
62. Villar del Fresno, Á. *Farmacognosia General*. Valle Hermoso, Madrid, España: Editorial Síntesis; 1999. Pág. 84-94.
63. Virues Elizondo, R. Estudio sobre ansiedad [Internet] Monterrey, Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2005. [Acceso 16 de abril de 2011] Disponible en: <http://www.psicologiacientifica.com>

GLOSARIO

Agudo: ocurre dentro de un periodo corto (minutos, horas o algunos días) en relación con el periodo de vida del organismo de ensayo.

ANOVA: ANalysis Of VAriance. El **análisis de la varianza** es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados, en el cual la varianza está particionada en ciertos componentes debidos a diferentes variables explicativas ya que compara la variabilidad de las medias muestrales (a través de la varianza muestral) con la variabilidad de los elementos dentro de la muestra.

Ansiolítico: (del lat. *anxius*, "angustiado", y el gr. λυτικός, "que disuelve") o tranquilizante menor es un fármaco con acción depresora del sistema nervioso central, destinado a disminuir o eliminar los síntomas de la ansiedad. Fármaco ansiolítico ideal es aquel que alivia o suprime el síntoma de ansiedad, sin producir sedación o sueño.

Bioensayo: ensayo en el cual el poder o potencia de una sustancia es medido a través de la respuesta de organismos vivos o sistemas vivientes.

Control: es un tratamiento en una investigación que duplica todos los factores que puedan afectar el resultado, excepto la condición que está siendo investigada (sinónimo de control negativo).

Control positivo: evaluación de la respuesta farmacológica con una sustancia de referencia, utilizada para controlar la sensibilidad de los organismos en el momento en el cual se evalúa el material problema.

Crónico: ocurre durante un periodo relativamente largo de exposición (una porción significativa de la vida del organismo >10%).

CE₅₀/CI₅₀: concentración efectiva o de inhibición media. Concentración del material en agua, suelo o sedimento que se estima afecta al 50% de los organismos de ensayo. La CE50 y sus límites de confianza (95%) son usualmente derivados de análisis estadístico.

CL₅₀: concentración letal media, concentración del material en agua, suelo o sedimento que se estima letal para el 50% de los organismos de ensayo. La CL₅₀ y sus límites de confianza (95%) son usualmente derivados de análisis estadístico.

Centinela (grupo centinela): grupo experimental que se le da un tratamiento con la sustancia ensayada, sirve como referencia en caso de recuperación en un proceso tóxico.

Comparaciones múltiples *post hoc*: permiten controlar la tasa de error al efectuar varios contrastes utilizando las mismas medias, es decir, permiten controlar la probabilidad de cometer errores tipo I al tomar varias decisiones.

Desviación estándar o desviación típica (denotada con el símbolo σ o s , dependiendo de la procedencia del conjunto de datos) es una medida de centralización o dispersión para variables de razón (ratio o cociente) y de intervalo, de gran utilidad en la estadística descriptiva.

Emenagogo (a): de origen griego, se utiliza para referirse a los principios activos, medicamentos o remedios a base de hierbas, que pueden estimular el flujo sanguíneo en el área de la pelvis y el útero, y en algunos casos, fomentar la menstruación. Los principios activos con estas propiedades pueden ser

usados en la terapia llamada emenagoga, en los casos de ausencia del flujo menstrual por razones distintas al embarazo.

Ensayo de toxicidad: determinación del efecto de un material o mezcla sobre un grupo de organismos seleccionados bajo condiciones definidas. Mide las proporciones de organismos afectados o el grado de efecto luego de la exposición a la muestra.

Espiar: cuando el ratón introduce la cabeza dentro de los agujeros hasta el nivel de las orejas.

Hematocrito: es el porcentaje del volumen total de la sangre compuesta por glóbulos rojos.

Histopatología: estudio al microscopio de los tejidos y de los órganos enfermos.

Índices de toxicidad: expresan los resultados de diferentes ensayos de toxicidad como un único valor numérico que clasifica, según categorías, a la muestra. No existen reglas fijas para la designación de los índices.

Liofilización: es un proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido. Para acelerar el proceso se utilizan ciclos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original.

Media aritmética (también llamada **promedio** o simplemente **media**) de un conjunto finito de números es el valor característico de una serie de datos cuantitativos objeto de estudio que parte del principio de la esperanza

matemática o valor esperado, se obtiene a partir de la suma de todos sus valores dividida entre el número de sumandos.

Microtomo: (del griego mikros, que significa "pequeño", y temnein, que significa "cortar") es un instrumento de corte que permite obtener rebanadas muy finas de material, conocidas como secciones. Los microtomos utilizan cuchillas de acero, vidrio o diamante, dependiendo del tipo de muestra que se esté cortado en lonjas y del grosor deseado de las secciones del corte.

Necropsia: proviene de las voces griegas νεκρός /nekrós/ 'cadáver' y ὄψις /opsis/ 'observar'. Es un procedimiento científico por el cual se estudia un cadáver animal para tratar de identificar la posible causa de la muerte, así como la identificación del cadáver. Consiste en el examen macroscópico de las vísceras y tejidos y en la toma de especímenes para su examen histopatológico.

Neurofarmacología: Estudio de los efectos de los medicamentos u otras sustancias sobre el sistema nervioso.

OECD: Organization for Economic Cooperation and Development. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE).

Patrón: llamado también estándar o control positivo es una sustancia utilizada como referencia al momento de hacer una valoración o estandarización.

Protocolo: es un conjunto de procedimientos explícitos para un ensayo o experimento, de acuerdo con lo establecido entre las partes y descrito en un documento.

Punto final: medida o valor que expresa el resultado de un ensayo (CL₅₀/CE₅₀/CI₅₀). También significa la respuesta del organismo para mostrar el

efecto que se utiliza para indicar la finalización del ensayo, definido por un porcentaje de organismos y un tiempo de exposición.

Sedante: es una sustancia química que deprime el sistema nervioso central (SNC), resultando en efectos potenciadores o contradictorios entre: calma, relajación, reducción de la ansiedad, adormecimiento, reducción de la respiración, habla trabada, euforia, disminución del juicio crítico, y retardo de ciertos reflejos. Un sedante suele denominarse como tranquilizante, antidepresivo, ansiolítico, soporífico, relajante, o sedante-hipnótico.

TOEC: concentración umbral a la cual se observa efecto (media geométrica del NOEC y LOEC).

Toxicidad: es una medida usada para medir el grado tóxico o venenoso de algunos elementos. Puede referirse al efecto de esta sobre un organismo completo, como un ser humano, una bacteria o incluso una planta o animal.

Toxicidad aguda: La toxicidad aguda tiene por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia. La observación de los animales se lleva a cabo después de la administración de la sustancia y dura hasta 14 días, después de los cuales los animales son sacrificados y autopsiados. En general, el test se realiza con 5 grupos de 10 animales de cada sexo, aunque existen algunos métodos abreviados que intentan reducir el número de animales a sacrificar.

Toxicidad subaguda: efectos tóxicos a largo plazo relacionados con cambios en el metabolismo, crecimiento o capacidad de supervivencia. La administración del fármaco se lleva a cabo diariamente durante periodos que oscilan entre 15 días y 4 semanas. Durante el estudio se controlan diariamente un buen número de parámetros (aspecto, comportamiento, peso, consumo de agua y alimento, ECG, examen oftalmoscópico, etc) y al final los animales son sacrificados y

autopsiados. Al inicio del estudio y antes de la autopsia, se toman muestras de sangre y orina para ser analizadas.

Tratamiento (grupo tratamiento): grupo experimental al cual se le administra la sustancia de ensayo o en estudio.

Tukey (1953). Diferencia honestamente significativa de Tukey. Equivale a utilizar el método de Student-Newman-Keuls con $r = J = n^{\circ}$ de medias. Por tanto, todas las comparaciones son referidas a una misma *diferencia mínima*. Es uno de los métodos de mayor aceptación.

ANEXOS

Anexo Nº 1

**Certificación de la especie vegetal por un experto Botánico. Herbario del
Jardín Botánico de La Laguna**

Anexo Nº 2

Procedimiento para la clasificación de la toxicidad iniciando con una dosis límite de 2000 mg/Kg de peso corporal

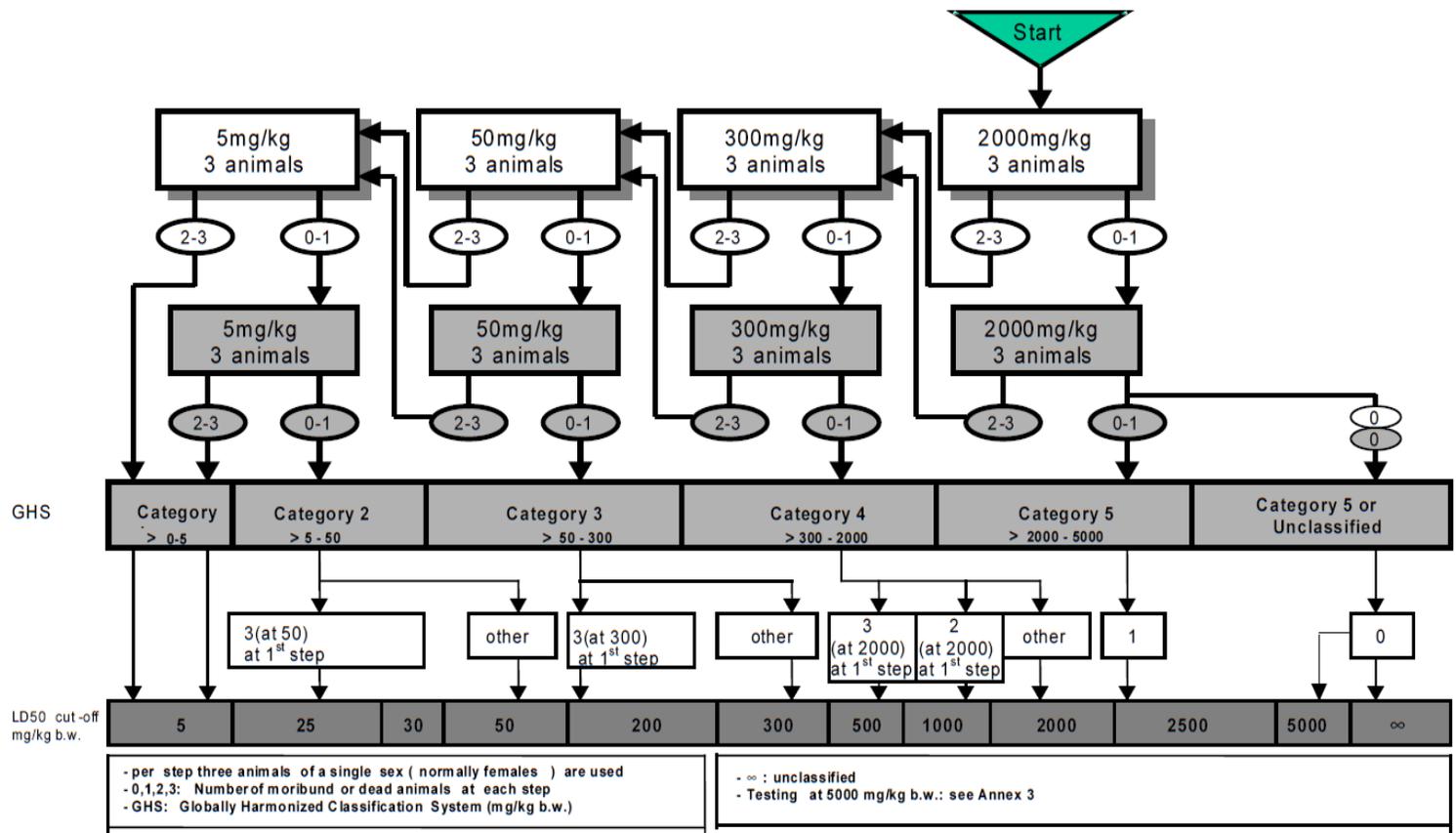


Diagrama del procedimiento a seguir para la clasificación de la toxicidad iniciando con una dosis límite de 2000 mg/Kg de peso corporal

Anexo N° 3

Fórmula general para determinar la cantidad de extracto acuoso liofilizado para preparar cualquier dosis mg/Kg de peso corporal

Ejemplo: para preparar una dosis de 2000 mg/Kg de peso corporal, tomando el peso promedio inicial del grupo centinela.

X= cantidad de extracto acuoso liofilizado

Z= peso promedio del grupo experimental = 20.67 g

P= cantidad en g de la sustancia a ensayar

$$X = \frac{(Z) \left(2000 \frac{mg}{Kg} \right)}{1 Kg}$$

$$X = \frac{(0.02067) \left(2000 \frac{mg}{Kg} \right)}{1 Kg}$$

$$X = Y = 41.34 \text{ mg}$$

Luego:

$$P = \frac{(\text{volumen a preparar})(Y)}{\text{volumen máximo de canulación}}$$

$$P = \frac{(10 \text{ mL})(41.34 \text{ mg})}{0.2 \text{ mL}}$$

$$P = 2067 \text{ mg} = 2.06 \text{ g}$$

Los cálculos anteriores se utilizan para la obtención de la cantidad de sustancia a pesar para preparar una solución o dosis determinada.

Anexo N° 4.

Evolución del peso corporal por grupo experimental en el ensayo de toxicidad subaguda a 28 días.

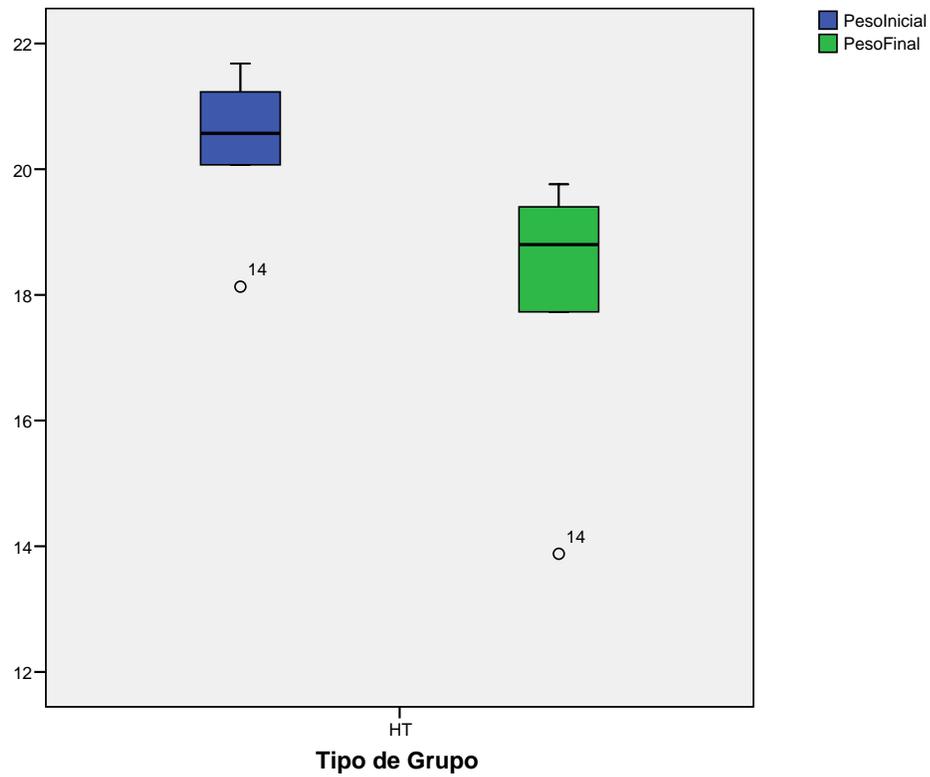


Figura N° 51. Evolución del peso corporal semanal del grupo tratamiento en hembras. Se puede apreciar la disminución del peso del grupo tratado con la sustancia en ensayo, a lo largo del ensayo de toxicidad subaguda.

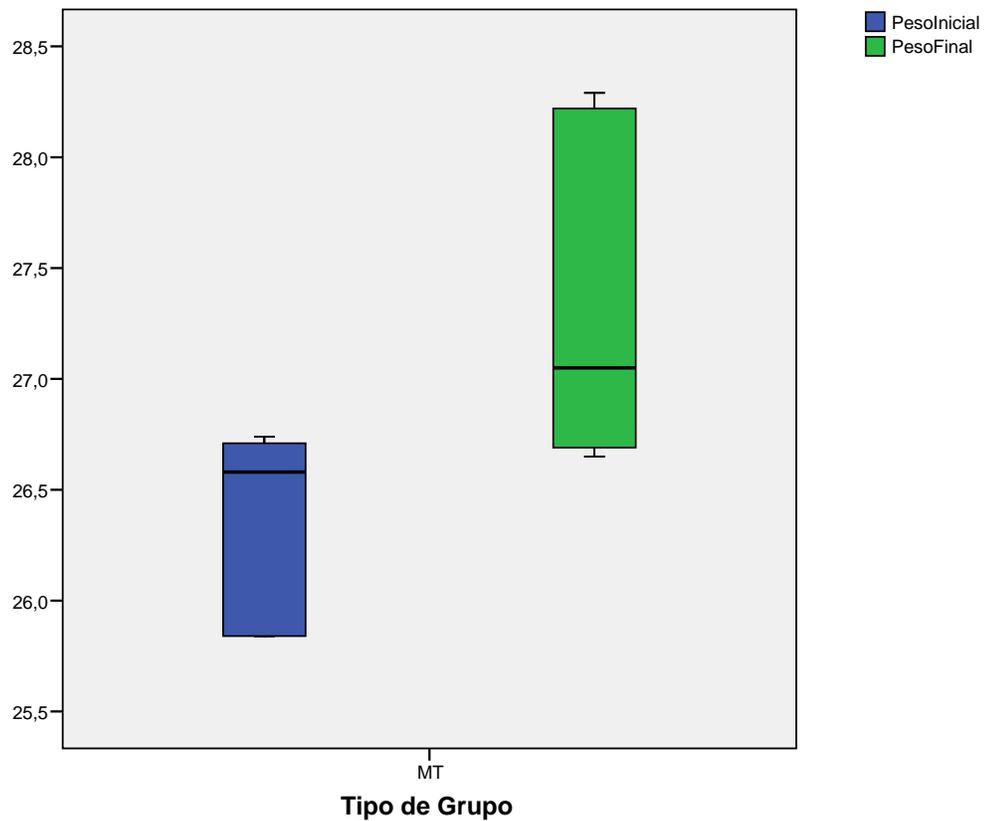


Figura N° 52. Evolución del peso corporal semanal del grupo tratamiento en machos. Para el grupo machos tratados con la sustancia, la administración diaria no afecto el aumento natural del peso a lo largo del ensayo de toxicidad subaguda.

Anexo N° 5.

Ensayo de toxicidad subaguda a 28 días. Registro de peso corporal.

Registro de Peso Corporal

Hembras

Grupo Control

Identificación animal	Peso Inicial	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Peso Final	Aumento %
1	20.9	23.21	23.84	24.06	24.86	18.95
2	21.18	22.6	22.1	22.19	22.87	7.98
3	20.45	21.57	20.95	21.93	21.72	6.21
4	17.23	18.52	18.35	19.68	19.98	15.96
5	20.81	21.45	20.75	21.48	21.84	4.95
Promedio	20.114	21.47	21.198	21.868	22.254	10.81

Grupo Centinela

Identificación animal	Peso Inicial	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Peso Final	Aumento %
1	21.85	21.72	22	20.92	21.72	-0.59
2	19.62	19.33	20.62	20.53	20.76	5.81
3	21.74	21.82	21.98	22.18	21.93	0.87
4	18.98	19.36	20.17	19.82	20.35	7.22
5	19.14	19.22	19.1	19.58	19.1	-0.21
Promedio	20.266	20.29	20.774	20.606	20.772	2.62

Grupo Tratamiento

Identificación animal	Peso Inicial	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Peso Final	Aumento %
1	20.57	19.83	20.65	20.48	19.4	-5.69
2	20.07	20.18	21.22	20.21	18.8	-6.33
3	21.68	21.19	22.13	21.89	17.73	-18.22
4	18.13	18.17	17.78	17.71	13.88	-23.44
5	21.23	21.24	22.05	22.05	19.76	-6.92
Promedio	20.336	20.122	20.766	20.468	17.914	-12.12

Registro de Peso Corporal

Machos

Grupo Control

Identificación animal	Peso Inicial	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Peso Final	Aumento %
1	23.81	23.69	22.95	23.91	24.25	1.85
2	23.4	24.13	25.2	24.85	22.23	-5
3	24.58	25.9	26.89	27.23	28.13	14.44
4	25.32	27.12	27.17	29.26	29.52	16.59
Promedio	24.2775	25.21	25.5525	26.3125	26.0325	6.97

Grupo Centinela

Identificación animal	Peso Inicial	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Peso Final	Aumento %
1	20.7	20.92	21.7	22.22	21.67	4.69
2	19.36	20.06	19.96	20.81	20.22	4.44
3	19.88	20.6	20.93	20.92	20.57	3.47
4	18.31	18.9	19.09	19.24	19.5	6.5
5	18.7	19.11	19.37	20.25	19.5	4.28
Promedio	19.39	19.918	20.21	20.688	20.292	4.676

Grupo Tratamiento

Identificación animal	Peso Inicial	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Peso Final	Aumento %
1	26.58	26.62	26	26.12	27.05	1.77
2	26.71	27.47	27.23	27.48	28.29	5.92
3	26.74	27.53	28.87	28.7	28.22	5.53
4	25.84	25	24.85	24.62	26.69	3.29
5	25.84	26.36	26.14	26.36	26.65	3.13
Promedio	26.342	26.596	26.618	26.656	27.38	3.928

Anexo N° 6.

Registro de peso de órganos.

Registro de Peso de órganos

HEMBRAS

Grupo Control

	Hígado	Corazón	Pulmones	Bazo	Riñones	Estómago	Intestinos
A1	1.22	0.1	0.14	0.24	0.17/0.15	0.84	2.24
A2	1.06	0.1	0.12	0.21	0.15/0.16	0.56	2.18
A3	0.86	0.12	0.09	0.22	0.3	0.53	1.82
A4	0.95	0.1	0.9	0.2	0.13/0.16	0.71	2.43
A5	1.07	0.12	0.13	0.18	0.17/0.16	0.61	2.58

Grupo Tratamiento

	Hígado	Corazón	Pulmones	Bazo	Riñones	Estómago	Intestinos
A1	1.12	0.1	0.13	0.19	0.17/0.15	0.46	2.13
A2	1.02	0.1	0.14	0.22	0.16/0.16	0.49	2.4
A3	1.15	0.1	0.17	0.18	0.16/0.16	0.72	2.54
A4	0.79	0.09	0.1	0.1	0.12/0.13	0.68	2.01
A5	1.04	0.1	0.13	0.22	0.15/0.18	0.79	2.48

MACHOS

Grupo Control

	Hígado	Corazón	Pulmones	Bazo	Riñones	Estómago	Intestinos
A1	1.19	0.13	0.13	0.14	0.19/0.20	0.46	2.47
A2	0.87	0.1	0.14	0.1	0.18/0.18	0.55	2.31
A3	1.39	0.13	0.14	0.21	0.22/0.23	0.64	2.64
A4	1.36	0.13	0.14	0.18	0.21/0.23	0.78	2.59

Grupo Tratamiento

	Hígado	Corazón	Pulmones	Bazo	Riñones	Estómago	Intestinos
A1	1.51	0.15	0.16	0.2	0.23/0.26	0.65	2.86
A2	1.41	0.12	0.16	0.18	0.25/0.26	0.62	3.37
A3	1.47	0.14	0.16	0.18	0.25/0.24	0.42	2.72
A4	1.42	0.11	0.13	0.11	0.35/0.22	0.45	2.17
A5	1.46	0.12	0.15	0.2	0.27/0.28	0.53	3.11

Anexo N° 7.

Registro de datos hematológicos.

Registro de datos hematológicos.

Hematologia							
N° Animal	Hemoglobina	Hematocrito	Neutrofilos	Linfocitos	Eosinofilos	Basofilos	RT Eritrocitos
HC1	13	39	58	38	4		58.5
HC2	14.33	43	52	37	10	1	64.5
HC3	13.33	40	56	44			60
HC4	13.67	41	60	40			61.5
HC5	14	42	52	44	2	2	65
HCe1	14	42	38	60	2		63
HCe2	14	42	60	36	4		63
HCe3	13.33	40	52	47	1		60
HCe4	13.67	41	52	48			61.5
HCe5	12.67	38	44	56			57
HT1	13.67	41	48	50	2		61.5
HT2	15	45	24	76			67.5
HT3	16.33	49	42	58			73.5
HT4	15	45	57	34	9		67.5
HT5	14.33	43	52	42	6		64.5
MC1	14.33	43	61	39			64.5
MC2	15.33	46	47	48	5		69
MC3	12	36	45	52	3		54
MC4	13.67	41	49	49	2		61.5
MCe1	13.67	41	52	44	4		61.5
MCe2	13.33	40	42	56	2		60
MCe3	14.33	43	52	30	18		64.5
MCe4	15	45	44	53	3		67.5
MCe5	13.33	40	55	41	3	1	60
MT1	13.67	41	60	28	8	4	61.5
MT2	14	42	36	64			63
MT3	14.33	43	32	65	2	1	64.5

Anexo N° 8.

Procesamiento de tejidos para los exámenes histopatológicos



Figura N° 53. Fijación del tejido animal en formalina.

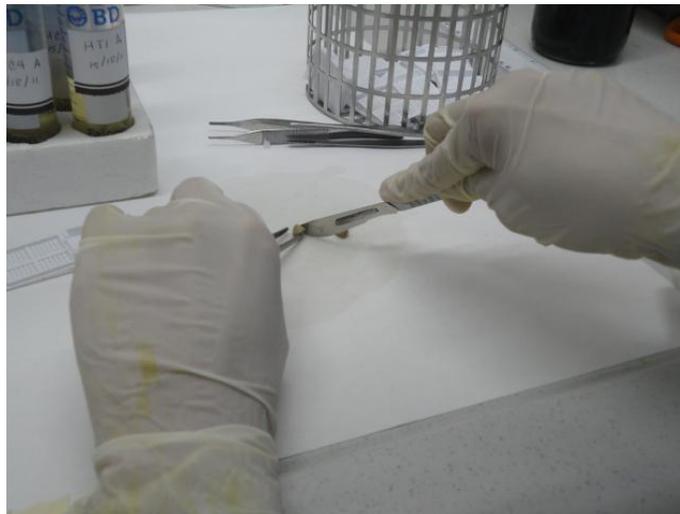


Figura N° 54. Tallado del tejido

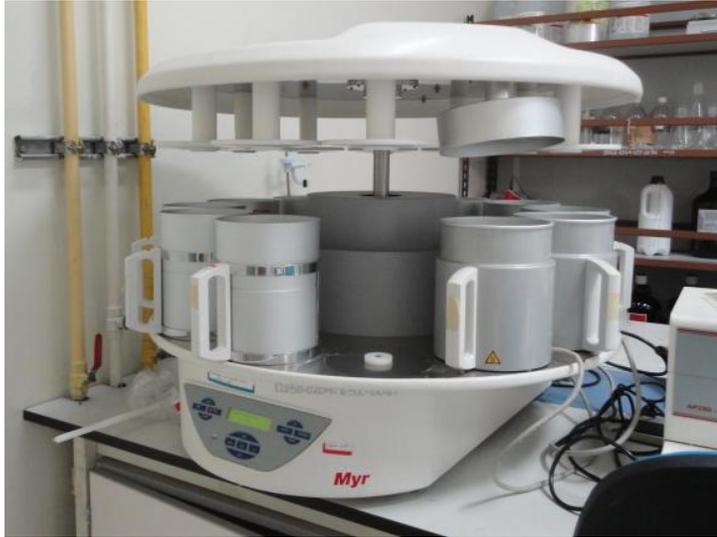


Figura N° 55. Equipo para realizar la inclusión de tejido.

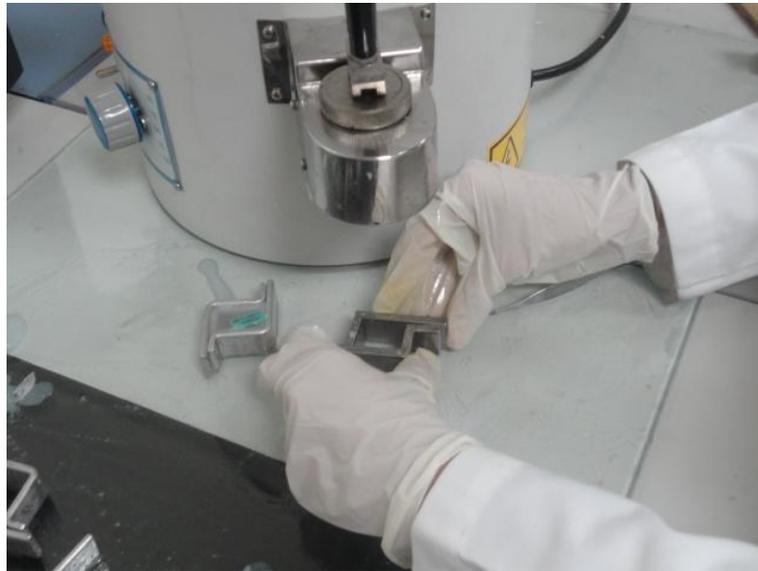


Figura N° 56. Formación del bloque parafinado



Figura N° 57. Equipo para realizar la microtomía u obtención de los cortes.

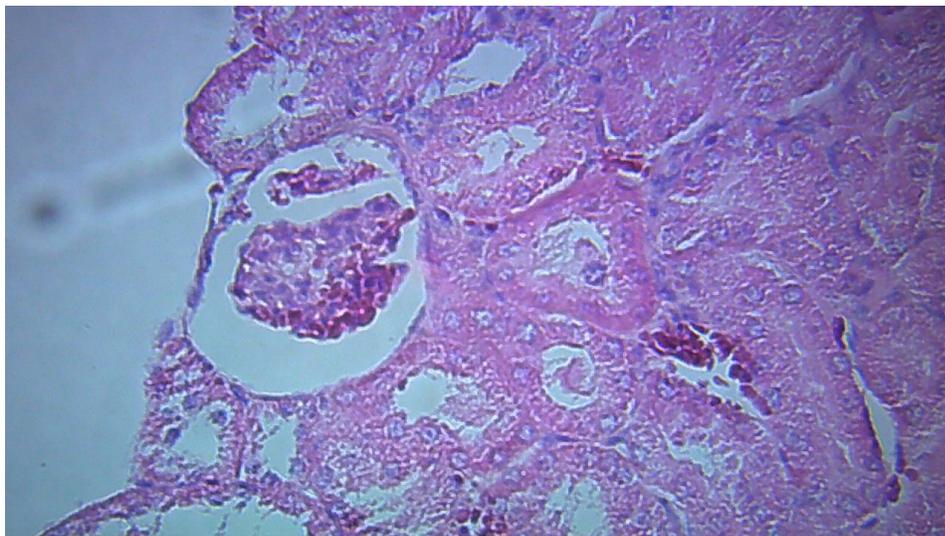


Figura N° 58. Vista al microscopio de un corte de riñón luego de la coloración hematoxilina-eosina.

Anexo N° 9.

Extracción de sangre de Seno Retro-orbital

Material: Capilares tratados con anticoagulante

Descripción de la técnica:

1. Sujetar al ratón estirando la piel del cuello hacia atrás asegurándose de no dificultar la respiración
2. Insertar el capilar en el ángulo externo del ojo (2 mm aproximadamente) y girar suavemente hasta que la sangre fluya por el mismo.
3. Recoger la muestra y retirar el capilar.
4. Oprimir ligeramente la zona de punción con una gasa o papel para detener la hemorragia.
5. Aplicar pomada oftálmica al ojo.

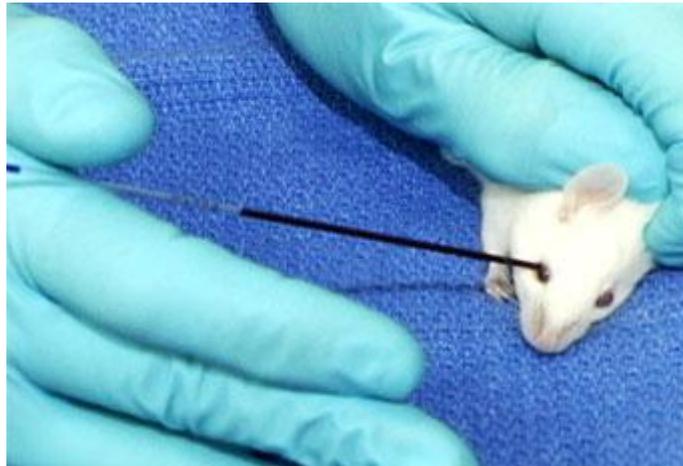


Figura N° 59. Técnica de extracción de sangre

Anexo N° 10.

Prueba de enterramiento de esferas



Figura N° 60. Prueba de enterramiento de esferas. Ratón ocultando esferas en la viruta de madera.



Figura N° 61. Prueba de enterramiento de esferas.

Anexo N° 11.

Prueba de laberinto en cruz elevado



Figura N° 62. Prueba de laberinto en cruz elevado. Inicio de la prueba, el ratón debe ser colocado al centro del laberinto y en posición de entrada a una de las zonas abiertas del laberinto.

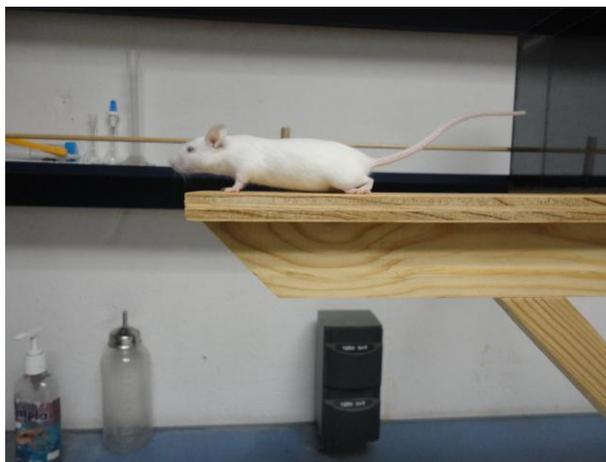


Figura N° 63. Prueba de laberinto en cruz elevado. Salida del ratón a una de las zonas abiertas del laberinto.



Figura N° 64. Prueba de laberinto en cruz elevado. Salida del ratón a una de las zonas abiertas del laberinto.

Anexo N° 12.

Suelo agujereado



Figura N° 65. Prueba de suelo agujereado. Ratón explorando uno de los agujeros.



Figura N° 66 Prueba de suelo agujereado. Ratón explorando uno de los agujeros, la exploración debe ser hasta el nivel de las orejas para tomar como positivo la conducta ansiolítica.

Anexo N° 13.

Sueño inducido por pentobarbital sódico

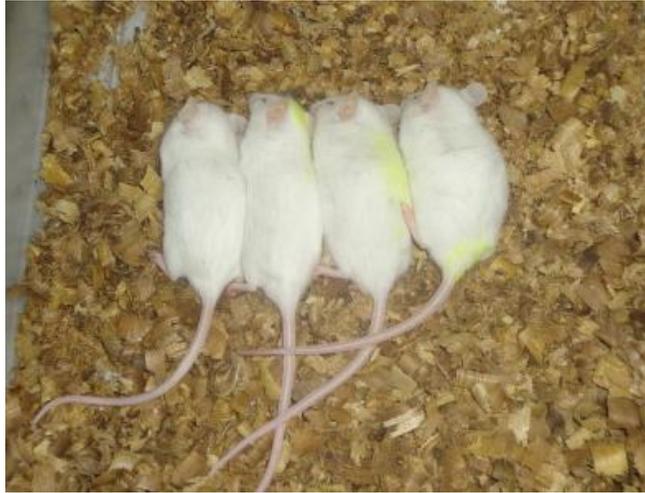


Figura N° 67. Prueba de sueño inducido por pentobarbital sódico. Grupo de ratones durante el período de sueño.



Figura N° 68 Prueba de sueño inducido por pentobarbital sódico. Grupo de ratones durante el período de sueño.

Anexo N° 14.

Equipos



Figura N° 69. Aparato Liofilizador (Christ Alpha 2-4, LDC-1M). Ubicación del aparato liofilizador: Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio Gonzalez", Universidad de La Laguna, Tenerife, España.



Figura N° 70. Procesador de tejido marca Myr. Ubicado en el Laboratorio de Patología, 3er nivel del edificio de CENSALUD, Universidad de El Salvador.



Figura N° 71. Micrótopo rotatorio (equipo para realizar cortes histológicos) ubicado en el Laboratorio de Patología, 3er nivel del edificio de CENSALUD, Universidad de El Salvador.

Anexo N° 15.

Reactivos

Preparación de reactivos para pruebas de precipitación:

- **Reactivo de Mayer:**

Solución a: 1.36 g HgCl_2 /60 mL H_2O

Solución b: 5 g KI/10 mL H_2O

Mezclar solución a y solución b, y diluir a 100 mL. (31)

- **Reactivo de Wagner:** disolver 1.27 g I_2 en 2g KI/5 mL H_2O , diluir a 100 mL.

- **Reactivo de Dragendorff:**

Solución a: disolver 0.85 g de nitrato básico de bismuto en una mezcla de 40 mL H_2O en 10 mL de ácido acético.

Solución b: 8 g de KI disueltos en 20 mL.

Mezclar solución a y solución b, dejar reposar 24 horas, aforar a 100 mL.

(34)

Reactivo para cromatografía en capa fina:

Reactivo de Dragendorff: (revelador)

Preparación:

Solución a: disolver 1.7 g de nitrato básico de bismuto en 20 g de ácido tartárico en 80 mL de agua destilada.

Solución b: disolver 16 g de yoduro de potasio en 40 mL de agua destilada.

Solución de reserva: Mezclar volúmenes iguales de solución a y b. Conservar en refrigeración.

Para usar: disolver 10 g de ácido tartárico en 50 mL de agua destilada y agregar 5 mL de solución de reserva. (41)