

Instituto de Neurología y Neurocirugía

Efectos de los extractos acuoso, etanólico, clorofórmico y toluénico de *Brunfelsia nitida* Benth sobre la conducta exploratoria y pruebas de analgesia

Lic. María Teresa Buznego Rodríguez,¹ Téc. Alfredo Cuba Peña,² MSc. Eneida Garriga Sarría,³ Dr. Armando Cuéllar Cuéllar⁴ y Dr. Héctor Pérez-Saad⁵

Resumen

Se evaluó el efecto neurofarmacológico de las fracciones acuosa, etanólica, clorofórmica y toluénica a partir de hojas secas de *Brunfelsia nitida* Benth, mediante su administración aguda sobre modelos de la conducta exploratoria y pruebas de analgesia. La fracción acuosa produjo un efecto sedante en la conducta exploratoria en la dosis de 100 y 500 mg/kg y redujo significativamente la respuesta al dolor en forma dosis dependiente en la prueba inducida por ácido acético, sin producir cambios en el tiempo de reacción del método del plato caliente. La fracción etanólica provocó una disminución significativa de la conducta exploratoria en la dosis de 200 mg/kg sin afectar la latencia y el tiempo de permanencia en el círculo central, así como una disminución de las contorsiones inducidas por ácido acético en las dosis de 40 y 200 mg/kg y en el tiempo de reacción del plato caliente. La fracción clorofórmica produjo efecto sedante en la conducta exploratoria a la dosis de 40 y 200 mg/kg, sin modificar la latencia y el tiempo de permanencia en el círculo central. Estas dosis redujeron significativamente la respuesta al dolor inducida por ácido acético sin modificar el tiempo de reacción. La fracción toluénica no modificó ninguno de los modelos empleados. No se observó paralelismo entre las curvas dosis-efecto de la conducta exploratoria y analgesia de cada fracción, por tanto los resultados sugieren que no existe relación molecular entre ambos efectos farmacológicos. En conclusión, los efectos sedantes y analgésicos encontrados parece que se deben a distintos principios activos.

Palabras clave: *Brunfelsia nitida* Benth, conducta exploratoria, analgesia.

El género *Brunfelsia* pertenece a la familia de las Solanáceas, ricas en alcaloides, la cual posee 42 especies encontradas en el oeste de la India y en el Sur de América. A este género se le ha atribuido por la población acciones antidiurética, emética, anestésica, abortiva, antiinflamatoria, analgésicas, estimulante del peristaltismo, narcótica, vértigo, entre otras. En especial, la *Brunfelsia nitida* Benth se utiliza para baños medicinales y se ha encontrado que sus frutos son ricos en alcaloides.¹

En este género, y específicamente en esta especie, no se han encontrado informaciones en la literatura en

los que se haya comprobado científicamente los efectos farmacológicos popularmente descritos.

Dentro de la neurología experimental, es de interés encontrar compuestos que permitan el tratamiento de síndromes neurológicos. Es conocido que algunos de estos síndromes concomitan con dolor como en el caso del dolor neural crónico, en la neuralgia del trigémino, neuropatías, entre otras.²⁻⁶ y un tratamiento inadecuado puede conducir a consecuencias adversas y ser causa de complicaciones clínicas y/o desarrollo del dolor crónico incidiendo en la calidad de vida del individuo.⁷

Basado en estas consideraciones, se hace necesaria la búsqueda de principios activos que presenten efectos sedantes y analgésicos.

El propósito del presente trabajo fue estudiar los posibles efectos sedantes y analgésicos de la planta mediante la administración aguda de las fracciones acuosa, etanólica, clorofórmica y toluénica, en modelos de analgesia y conducta exploratoria, y valorar si los mecanismos moleculares responsables de estos efectos se encuentran relacionados.

Métodos

La especie *Brunfelsia nitida* fue identificada por el Dr. *Víctor Fuentes Fiallo* y registrada con el número de herbario ROIG 4704. Fue recolectada en el mes enero de 2002.

Los experimentos se realizaron en ratones machos, de la línea OF1, de 18 a 22 g de peso corporal. Se utilizaron 4 grupos de animales a los cuales se les administraron correspondientemente 3 dosis de una fracción de la planta y salina (NaCl 0,9 %) al grupo control, con excepción de la fracción etanólica en donde el control recibió etanol al 6 % en solución salina.

El extracto etanólico se diluyó en polivinilpirrolidona al 1 % y después de secado al baño de maría se disolvió en etanol al 6 % en solución salina. La fracción acuosa se empleó en las dosis de 20, 100, 500 y 1 000 mg/kg, en las restantes fracciones se emplearon las dosis de 8, 40 y 200 mg/kg.

Las fracciones y la solución se administraron por vía intraperitoneal, en volumen de 0,01 mL/g de peso corporal, 30 min antes de comenzar la observación.

Método de extracción

Consistió en secado al aire del material vegetal, a temperatura ambiente. Luego, este material se trituró hasta quedar en pedazos muy pequeños y se colocó en un dedal de un equipo soxhlet de extracción continua (80 g de planta y 750 mL). Las extracciones se realizaron durante 8 a 16 h, de forma sucesiva sobre el mismo material vegetal con los siguientes disolventes: cloroformo, tolueno, etanol y agua.⁸ Las fracciones de forma independiente se concentraron a extracto seco con la utilización de un rotoevaporador al vacío, calculándose su rendimiento por gravimetría y se guardaron en desecadora hasta el momento de realizar su evaluación biológica.

Conducta exploratoria

La conducta exploratoria se observó en ratones mediante un recipiente de campo abierto, con una pared de 15 cm de alto y un diámetro de 30 cm. En el piso se dibujó un círculo concéntrico de 10 cm de diámetro.⁹ La observación comenzó con la colocación del animal en el círculo central y a partir de ese momento se midieron los indicadores siguientes: 1. latencia (tiempo inicial transcurrido en el círculo central), 2. número de empinamientos, 3. número de veces que el animal atraviesa el círculo central-conducta diagonal y 4. tiempo de permanencia total transcurrido en el círculo central durante el tiempo de observación. Se empleó un cronómetro manual-mecánico y el tiempo total de observación fue de 6 min.

Pruebas de analgesia

Prueba del ácido acético. Se inyectó ácido acético al 0,6 % por vía intraperitoneal y se observaron inmediatamente las contorsiones y estiramientos producidos durante 20 min.¹⁰

Plato caliente. Los ratones se colocaron encima de una plancha metálica puesta en contacto directo con el agua de un ultratermostato mediante unas paletas soldadas en su superficie inferior.¹⁰ Los ratones fueron restringidos en su movimiento con el empleo de un cilindro de vidrio de 10 cm de diámetro y 15 cm de altura, la temperatura empleada fue de $54 \pm 1^\circ \text{C}$. El tiempo de reacción se tomó como el tiempo de demora de lamido de una de las patas traseras o salto y el tiempo de observación total fue de 2 min.

Resultados

Las dosis de 100 y 500 mg/kg de la fracción acuosa provocaron una disminución significativa del número de cruces más empinamientos (tabla 1), sin afectar la latencia, ni el tiempo de permanencia total en el círculo central.

Tabla 1. *Efectos de diferentes dosis de la fracción acuosa de B. nítida sobre la conducta exploratoria*

| | Solución salina | Dosis (mg/kg) | | |
|---------------|-----------------|---------------|-----|-----|
| | | 20 | 100 | 500 |
| Latencia (s) | 1,1 | 1,2 | 1,2 | 1,4 |
| T-círculo (s) | 9,2 | 8,8 | 6,7 | 5,1 |

| | | | | |
|------------------------------|------|------|--------|--------|
| No. Cruces más empinamientos | 50,4 | 38,8 | 25,0 * | 25,7 * |
|------------------------------|------|------|--------|--------|

n = 10. Los datos representan las medias.

T - círculo: tiempo de permanencia total transcurrido en el círculo central.

* ($p < 0,05$) respecto a solución salina según las pruebas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney.

El efecto de la dosis de 1 000 mg/kg del extracto acuoso sobre la conducta exploratoria no se muestra, ya que el tratamiento con este extracto provocó movimiento de sacudidas, cola de Straub, convulsiones mioclónicas y convulsiones tónico clónicas secundariamente generalizadas que condujeron a la muerte del animal de forma inmediata.

La fracción acuosa disminuyó significativamente el número de contorsiones y estiramientos inducidos por ácido acético, en una forma dependiente de la dosis, pero no afectó el tiempo de reacción del plato caliente (tabla 2).

Tabla 2. *Efecto de diferentes dosis de la fracción acuosa de B. nitida sobre el método del plato caliente y la prueba de ácido acético*

| Dosis (mg/kg) | Tiempo de reacción: lamidos de patas traseras o saltos (s) | Número de estiramientos y contorsiones |
|-----------------|--|--|
| Solución salina | 5,5 | 55,0 |
| 20 | 6,6 | 35,4* |
| 100 | 8,2 | 22,6 ** |
| 500 | 6,0 | 0,8** |

n = 10. Los datos representan las medias.

* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) respecto a solución salina según las pruebas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney.

En la figura 1, se puede observar la ausencia de paralelismo entre las curvas dosis-efecto de la conducta exploratoria y de la prueba de analgesia.

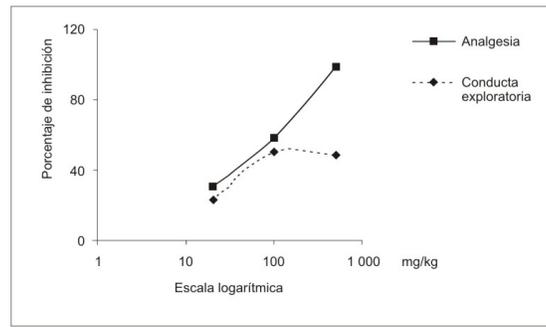


Fig. 1. Curvas dosis-efecto del extracto acuoso de *B. nitida* de la conducta exploratoria y de la prueba de irritación peritoneal inducida por ácido acético.

La administración aguda de la fracción etanólica produjo una disminución significativa del número de cruces más empinamientos con la dosis de 200 mg/kg (tabla 3), sin afectar la latencia y el tiempo de permanencia total transcurrido en el círculo central.

Tabla 3. Efectos de diferentes dosis de la fracción etanólica de *B. nitida* sobre la conducta exploratoria

| | Diluyente | Dosis (mg/kg) | | |
|------------------------------|-----------|---------------|------|---------|
| | | 8 | 40 | 200 |
| Latencia (s) | 1,0 | 1,2 | 1,0 | 1,1 |
| T-círculo (s) | 12,3 | 9,2 | 8,8 | 7,1 |
| No. cruces más empinamientos | 41,6 | 30,4 | 30,0 | 18,78 * |

n = 10. Los datos representan las medias.

Diluyente: etanol al 6% en solución salina.

T - círculo: tiempo de permanencia total transcurrido en el círculo central.

* ($p < 0,05$), respecto al diluyente según las pruebas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney.

La fracción etanólica disminuyó significativamente el número de contorsiones y estiramientos inducidos por ácido acético a las dosis de 40 y 200 mg/kg, así como en las dosis de 8 y 200 mg/kg el extracto disminuyó significativamente el tiempo de reacción del plato caliente (tabla 4).

Tabla 4. Efecto de diferentes dosis de la fracción etanólica de *B. nitida* sobre el método del plato caliente y la prueba de ácido acético

| Dosis (mg/kg) | Tiempo de reacción: lamidos de patas traseras o salto (s) | Número de estiramientos y contorsiones |
|---------------|---|--|
| Diluyente | 9,6 | 29,8 |
| 8 | 5,0* | 19,8 |
| 40 | 8,7 | 5,3 ** |
| 200 | 4,1* | 3,8** |

n = 10. Los datos representan las medias.

Diluyente: etanol al 6 % en solución salina.

* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) respecto al diluyente según las pruebas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney.

La figura 2 muestra 2 curvas dosis-efecto de la fracción etanólica, una de la conducta exploratoria y otra, de la prueba de analgesia plantar, las cuales no son coincidentes.

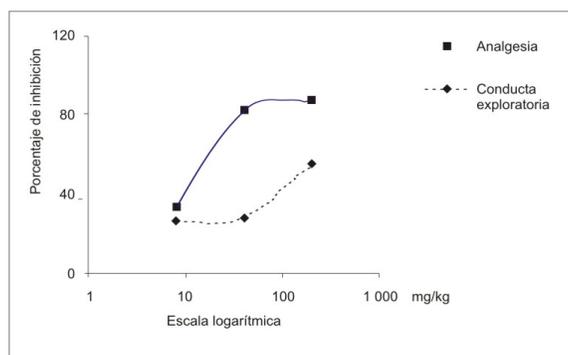


Fig. 2. Curvas dosis-efecto del extracto etanólico de *B. nítida* de la conducta exploratoria y de la prueba de irritación peritoneal inducido por ácido acético.

La fracción clorofórmica provocó una disminución significativa del número de cruces más empinamientos con la administración de las dosis 40 y 200 mg/kg (tabla 5). Sin embargo no afectó la latencia, ni el tiempo de permanencia total en el círculo central.

Tabla 5. Efectos de diferentes dosis de la fracción clorofórmica de *B. nítida* sobre la conducta exploratoria

| | Solución salina | Dosis (mg/kg) | | |
|------------------------------|-----------------|---------------|-------|--------|
| | | 8 | 40 | 200 |
| Latencia (s) | 1,7 | 1,2 | 1,1 | 1,1 |
| T-círculo (s) | 20,2 | 24,0 | 23,5 | 13,8 |
| No. cruces más empinamientos | 42,3 | 32,4 | 11,1* | 10,8 * |

n = 10. Los datos representan las medias.

T - círculo: tiempo de permanencia total transcurrido en el círculo central.

* ($p < 0,001$), respecto a solución salina según las pruebas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney.

La fracción de cloroformo disminuyó significativamente el número de contorsiones y estiramientos inducidos por ácido acético en las dosis de 40 y 200 mg/kg. El tiempo de reacción del plato caliente no fue modificado por la fracción de cloroformo (tabla 6).

Tabla 6. *Efecto de diferentes dosis de la fracción clorofórmica de B. nítida sobre el método del plato caliente y la prueba de ácido acético*

| Dosis (mg/kg) | Tiempo de reacción: lamidos de patas traseras o salto (s) | Número de estiramientos y contorsiones |
|-----------------|---|--|
| Solución salina | 9,7 ± 1,4 | 37,0 ± 3,1 |
| 8 | 13,7 ± 1,9 | 26,8 ± 5,7 |
| 40 | 8,2 ± 1,7 | 17,5 ± 3,1 * |
| 200 | 11,9 ± 2,0 | 12,4 ± 3,0 * |

n = 10. Los datos representan las medias ± errores estándares.

* ($p < 0,001$), respecto a solución salina según las pruebas de ANOVA y Duncan.

En la figura 3, se puede observar la ausencia de paralelismo entre las curvas dosis-efecto de la conducta exploratoria y de la prueba de analgesia con la fracción de cloroformo.

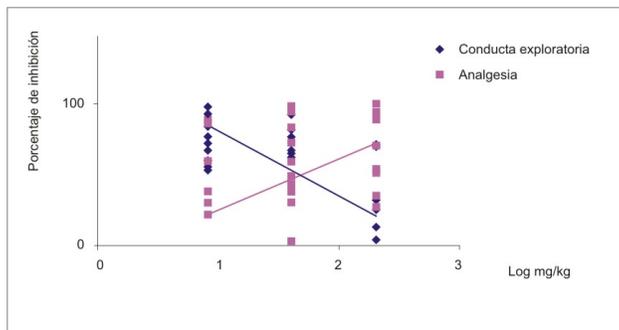


Fig. 3. Curvas dosis-efecto del extracto clorofórmico de *B. nitida* de la conducta exploratoria y de la prueba de irritación peritoneal inducida por ácido acético. Se realizó un ajuste en las curvas dosis-efecto y en la comparación de las pendientes de las rectas se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) según la prueba de regresión (rectas no paralelas). $n = 10$.

La administración aguda de la fracción toluénica no ejerció efecto alguno sobre los indicadores de la conducta exploratoria (tabla 7).

Tabla 7. *Diferentes dosis de la fracción toluénica de B. nitida sobre la conducta exploratoria*

| | Solución salina | Dosis (mg/kg) | | |
|------------------------------|-----------------|---------------|------|------|
| | | 8 | 40 | 200 |
| Latencia (s) | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| T-círculo (s) | 5,3 | 13,4 | 11,1 | 13,5 |
| No. cruces más empinamientos | 31,9 | 32,7 | 31,5 | 43,4 |

$n = 10$. Los datos representan las medias.

T - círculo: tiempo de permanencia total transcurrido en el círculo central.

La fracción de tolueno no modificó el número de contorsiones y estiramientos inducidos por ácido acético, ni sobre el tiempo de reacción del plato caliente (tabla 8).

Tabla 8. *Diferentes dosis de la fracción toluénica de B. nitida sobre el método del plato caliente y la*

prueba de ácido acético

| Dosis (mg/kg) | Tiempo de reacción: lamidos de patas traseras o saltos (s) | Número de estiramientos y contorsiones |
|-----------------|--|--|
| Solución salina | 8,8 ± 0,8 | 29,1 ± 6,1 |
| 8 | 8,1 ± 2,5 | 39,7 ± 7,4 |
| 40 | 6,8 ± 3,0 | 30,6 ± 4,9 |
| 200 | 8,4 ± 3,7 | 24,2 ± 5,6 |

n = 10. Los datos representan las medias ± errores estándares.

Discusión

Los resultados demuestran la presencia en la *Brunfelsia nitida* de principios activos con acciones analgésica y sedante. La falta de paralelismos entre las curvas de ambos efectos pudiera indicar que los mecanismos moleculares correspondientes a estas acciones son diferentes. Esto se corresponde con el hecho de que el efecto analgésico se manifiesta sólo en el modelo de irritación peritoneal por ácido acético, particularmente sensible a los analgésicos de acción periférica.^{11,12}

Con la excepción del extracto etanólico, el cual produjo una disminución significativa del tiempo de reacción en el plato caliente, el resto de los extractos no tuvieron efecto en este modelo, por lo que la planta no parece tener principios activos con acción analgésica central. El efecto hiperalgésico de dicho extracto pudiera corresponderse con las características y los mecanismos moleculares de los barbitúricos, los que suelen ser hiperalgésicos cuando se administran a dosis subanestésicas, particularmente en individuos con presencia de dolor.¹³

El efecto sedante de los extractos en la conducta exploratoria debe estudiarse en otros modelos que permitan tipificar este efecto dentro de la clasificación de los psicofármacos de referencia, tales como ansiolíticos, antidepresivos, neurolépticos, entre otros.

Los efectos aquí descritos de la planta están en correspondencia con algunos de los usos informados para el género de las Solanáceas dentro de la medicina tradicional, al cual se le atribuye acciones antiinflamatoria, analgésica, anestésica, y narcótica.¹

En conclusión, los efectos sedantes y analgésicos encontrados parece que se deben a distintos principios activos.

Summary

Effects of aqueous, ethanol, chloroform and toluene extracts of *Brunfelsia nitida* Benth on the animal's exploring behavior and analgesia tests

The neuropharmacological effect of aqueous, ethanol, chloroform and toluene fractions from *Brunfelsia nitida* Benth dry leaves, through acute administration, on animal's exploring behavior and analgesia test models was assessed. The aqueous fraction had a sedative effect on animal's exploring behavior at doses of 100 and 500 mg/kg and significantly reduced dose-dependent response to pain in acetic acid-induced test, without changes in the reaction time of the hot-plate method. The ethanol fraction brought about a significant reduction of the animal's exploring behavior at a dose of 200 mg/kg without affecting latency and length of stay in the 10-cm central circle as well as a decrease in acetic acid-induced contortions at doses of 40 and 200 mg/kg and in the reaction time of the hot-plate method. The chloroform fraction had a sedative effect on the animal's exploring behavior at doses of 40 and 200 mg/kg without changing latency and length of stay in the 10-cm diameter. central circle. These doses significantly reduced acetic acid-induced response to pain without modifying the reaction time. The toluene fraction did not change any of the used models. No parallelism was observed between the dose-effect curves of the animal's exploring behavior and the analgesia test of each fraction; therefore, the results indicate that there is no molecular relation between both pharmacological effects. In conclusion, the sedative and analgesic effects seem to be caused by different active principles.

Key words: *Brunfelsia nitida* Benth, exploring behavior, analgesia.

Referencias bibliográficas

1. Plowman T. *Brunfelsia* in ethnomedicine. Bot Mus Leaflet Harvard Univ. 1977;25:298-320.
2. Sweet WH. The treatment of trigeminal neuralgia. N Engl J Med. 1981;315:174 -7.
3. Taylor J, Brower S, Spir ML. Long term treatment of trigeminal neuralgia with carbamazepine. Rev Postgrad Med J. 1981;57:16-8.
4. Alexander J, Black A. Pain mechanisms and the management of neuropathic pain. Curr Opin Neurol Neurosurg. 1992;5:228-34.
5. Backonja MM. Painful Neuropathies. In: Loeser JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DC, editors. Bonica's Management of Pain. 3rd ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 371-87.

- Merskey H, Bugduk N. Classification of Chronic Pain. Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms. 2nd ed. Seattle, WA: IASP Press; 1994.
7. Becker N, Bondegaard Thomsen A, Olsen AK. Pain epidemiology and health related quality of life in chronic non-malignant pain patients referred to a Danish multidisciplinary pain center. *Pain*. 1997;73:393-400.
 8. Hostettmann K, Hostettmann M, Marston A. Sample preparation and purification. In: Preparative chromatographic techniques: applications in natural products isolation and purification. Berlin: Springer Verlag;1986.
 9. Voghel HG, Voghel WH, editors. Drugs discovery and evaluation: pharmacological assays. Berlin: Springer;1997.p.204-315.
 10. Turner RA, editor. Screening methods in pharmacology. New York: Academic Press; 1965. p.100-17.
 11. Collier HO, Dinnen LC, Johnson CA, Schneider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br J Pharmacol*. 1968;32:295-310.
 12. de Farias SM, da Silva JA, Lapa AJ, Souccar C, Brandao LM. Analgesic and antiinflammatory properties of *Scoparia dulcis* L. extracts and glutinol in rodents. *Phytother Res*. 1993;7:408-14.
 13. Hobb WR, Rall TW, Verdoorn TA. Hipnóticos y sedantes; etanol. In: Hardman JG, Limbird LE, Molonoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A, editors. Las bases farmacológicas de la terapéutica. México: McGraw-Hill Interamericana; 1996. p. 385-422.

Recibido: 2 de septiembre de 2005. Aprobado: 9 de septiembre e 2005.

Lic. *María Teresa Buznego Rodríguez*. Instituto de Neurología y Neurocirugía. Avenida 29 y calle D, Habana 10400, Plaza de La Revolución. La Habana, Cuba. Teléfono: 553034 e-mail: cebimar@infomed.sld.cu

¹ **Licenciada en Ciencias Biológicas. Investigadora Auxiliar.**

² **Técnico en Investigación Científica.**

³ **Máster en Informática en Salud. Licenciada en Matemática. Profesora Auxiliar.**

⁴ **Doctor en Ciencias Químicas. Máster en Ciencias. Profesor Titular.**

⁵ **Doctor en Ciencias Médicas. Investigador Titular.**