

Efecto sedante, ansiolítico y toxicológico del extracto acuoso de flores de *Erythrina berteroana* (pito) en ratones

Sedative, anxiolytic and toxicological effect of an aqueous extract from *Erythrina berteroana* (pito) flowers in mice

Lic. Jessica Amanda Bonilla,^I Lic. Ana Miriam Santa Maria,^I Lic. Gonzalo Toloza,^{II} Dr. Paul Espinoza Madrid,^{II} Lic. Jesus Noel Avalos,^{II} Dr. Marvin J. Nuñez,^{II} Lic. Miguel Moreno^I

^I Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia, Laboratorio de Patología, Centro de Investigación y Desarrollo en Salud. Universidad de El Salvador.

^{II} Laboratorio de Química Clínica, Departamento de Patología. Hospital Nacional Rosales. El Salvador.

RESUMEN

Introducción: *Erythrina berteroana* Urb., comúnmente conocida como "pito", es una planta ampliamente distribuida en El Salvador de la que tradicionalmente se afirma que posee propiedades sedantes y ansiolíticas.

Objetivos: evaluar el efecto sedante, ansiolítico y toxicológico del extracto acuoso liofilizado de las flores de *Erythrina berteroana*.

Métodos: el efecto sedante y ansiolítico del extracto acuoso de las flores desecadas de *E. berteroana*, a las dosis de 100, 250 y 500 mg/kg de peso corporal fue evaluado por medio de pruebas no condicionadas en ratones de ambos sexos. Así mismo se evaluó la toxicidad vía oral a una dosis límite de 2 000 mg/kg de peso corporal durante 28 días.

Resultados: las pruebas fitoquímicas demuestran la presencia de alcaloides, triterpenos y flavonoides en flores de *E. berteroana*. Así mismo, no se observan alteraciones en el estado de salud de los animales experimentales. Además, demuestran que la sustancia de ensayo no posee efecto sedante, pero sí una actividad ansiolítica al disminuir el miedo natural a lo desconocido, a los espacios abiertos, a las alturas y las esferas.

Conclusiones: los resultados de la presente investigación demuestran que no existe un efecto sedante, pero sí un efecto ansiolítico ligeramente efectivo del extracto acuoso de las flores de *E. berteroana*, que puede ser atribuido a la presencia principalmente de alcaloides y flavonoides en la sustancia de estudio.

Palabras clave: toxicidad subaguda, actividad ansiolítica, *Erythrina berteroana*.

ABSTRACT

Introduction: *Erythrina berteroana* Rub., commonly known as *pito*, is a plant of wide distribution in El Salvador which has traditionally been attributed sedative and anxiolytic properties.

Objectives: evaluate the sedative, anxiolytic and toxicological effect of lyophilized aqueous extract of *Erythrina berteroana* flowers.

Methods: the sedative and anxiolytic effect of the aqueous extract of dried *E. berteroana* flowers was evaluated at doses of 100, 250 and 500 mg/kg of body weight using unconditioned tests in mice of both sexes. Oral toxicity was also evaluated at a limit dose of 2 000 mg/kg of body weight for 28 days.

Results: phytochemical testing revealed the presence of alkaloids, triterpenes and flavonoids in *E. berteroana* flowers. No alterations were observed in the health status of experimental animals. It was shown that the test substance does not have a sedative effect, but it does have anxiolytic activity, reducing the natural fear of open spaces, heights, spheres and the unknown.

Conclusions: results show that *E. berteroana* aqueous flower extract has no sedative effect, but it does have a slightly effective anxiolytic effect, which could be mainly attributable to the presence of alkaloids and flavonoids in the study substance.

Key words: subacute toxicity, anxiolytic activity, *Erythrina berteroana*.

INTRODUCCIÓN

Las poblaciones alrededor del mundo siguen utilizando las plantas con propiedades medicinales como resultado de circunstancias históricas, utilización etnobotánica o creencias culturales que ayudan a satisfacer sus necesidades sanitarias.¹ En países en vías de desarrollo, el amplio uso de este tipo de terapias se atribuye a su accesibilidad y asequibilidad, y muchas veces es la única fuente disponible de atención sanitaria, especialmente para los pacientes de más escasos recursos; y además es popular por estar firmemente arraigada en los sistemas de creencias.² Por su parte, la Organización Mundial para la Salud (OMS) ha insistido en que el uso de plantas medicinales puede ser de gran aplicación en la atención primaria de los sistemas de salud, pero sobre bases científicas que sustenten seguridad, efectividad y calidad requeridas para administración en humanos.³

Según estimaciones proporcionadas en el *Informe de Salud Mundial 2001* de la OMS, alrededor de 450 millones de personas padecen de trastornos mentales. Una de cada cuatro personas desarrollará uno o más trastornos mentales o de conducta incluidos el insomnio primario y la ansiedad a lo largo de su vida.⁴ El impacto económico de estos trastornos es amplio, duradero y enorme e impone una serie de

costos en los individuos, familias y comunidades que supone a su vez una carga cada vez más alta en los servicios de atención social y de salud.⁵ En este sentido y precisamente en países como El Salvador, que poseen en su gran mayoría una rica flora, la búsqueda y validación de nuevas terapias para diversos trastornos como la ansiedad y el insomnio a base de plantas medicinales es imprescindible.

Erythrina berteroana Urb., conocida popularmente con los nombres de "pito" y "quillite", es una especie de tamaño arbóreo o arbusto pequeño, se reproduce muy bien de manera vegetativa por estacas, es ampliamente distribuida en El Salvador como parte de cercas vivas, o como ornamental; y tradicionalmente buena parte de la población afirma que posee propiedades sedantes, ya que al consumir las flores (cáliz y corola), preparadas en diversos alimentos, al igual que las hojas jóvenes (brotes), provocan somnolencia, haciendo dormir profundamente a las personas, pero su consumo es limitado, debido a las propiedades tóxicas que se le atribuyen. Este género, pertenece a la familia Fabaceae, y se encuentra químicamente dotada de algunos grupos de sustancias de diversa composición química, de entre los que se encuentran mayoritariamente alcaloides y flavonoides.⁶

La presencia de alcaloides en flores de *E. berteroana* reportada en un estudio reciente,⁷ pone en evidencia el potencial sedante y ansiolítico de esta especie, por cuanto son sustancias químicas que ya fueron reportadas como responsables de los efectos neurofarmacológicos de otras especies de este género.^{8,9,10} En consideración a lo anterior, la presente investigación se llevó a cabo con el objetivo principal de evaluar el efecto sedante, ansiolítico y toxicológico del extracto acuoso de las flores de *E. berteroana*.

MÉTODOS

Material vegetal

La recolección de las flores de *Erythrina berteroana* Urb. (Fabaceae) popularmente conocida como "pito", se realizó en el Municipio de Apopa, Departamento de San Salvador, El Salvador en abril de 2011. Una muestra de la especie vegetal fue depositada con número de registro 60205 en el Herbario de la Universidad de El Salvador (ITIC) y taxonómicamente identificada por la curadora, botánica experta MSc. Nohemí Elizabeth Ventura Centeno.

Las flores de *E. berteroana*, se secaron a temperatura ambiente, se pulverizaron y se almacenaron en un lugar fresco y seco. Se pesaron 400 g y se extrajo a reflujo (3 × 7 h), utilizando como disolvente agua destilada. El extracto se sometió al proceso de liofilización, con la finalidad de eliminar el solvente de extracción. En primer lugar, el extracto fue congelado a -50 °C y después por sublimación el disolvente se eliminó a través de un sistema de vacío, mediante un aparato liofilizador, marca ChristAlpha 2-4, LDC-1M. Las muestras congeladas (25 ml) en balones de 250 mL se introdujeron en la urna-bandeja de vacío a una temperatura de -50 °C y se colocaron en las gomas azules del liofilizador.

Identificación de alcaloides

Pruebas químicas de precipitación

Se pesó 1 g de extracto acuoso liofilizado de *E. berteroana* y se disolvió con un 1 mL de agua, se adicionó a continuación 6 mL de HCl al 10 %, esta solución se filtró y se distribuyó en tres tubos para realizar las pruebas químicas cualitativas de precipitación de Mayer, Wagner y Dragendorff.¹¹

Cromatografía en capa fina

Se realizó sobre una placa (5 × 6 cm) de gel de sílice tipo G, de 0,25 mm de espesor, utilizando como fase móvil cloroformo-metanol-agua (2,0: 7,5: 0,5) y como revelador, el reactivo de Dragendorff y la evidencia positiva, la presencia de manchas color naranja.

Identificación de glicósidos cardiotónicos

Cromatografía de capa fina

Se realizó sobre una placa (5 × 6 cm) de gel de sílice tipo G, de 0,25 mm de espesor, utilizando como fase móvil acetato de etilo-metanol-agua (8: 1: 1) y como revelador el reactivo de Kedde.¹¹

Identificación de glicósidos saponínicos

Prueba de la espuma

Se colocó una pequeña porción de la droga seca y pulverizada en un tubo de ensayo, se añadió 3 mL de agua destilada y se agito vigorosamente durante 30 seg y dejar reposar.

Prueba de Salkowski

Se tomó 3 mL de una solución de extracto acuoso liofilizado y se le agregaron 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado, gota a gota por las paredes del tubo.¹¹

Identificación de glicósidos antraquinónicos

Cromatografía de capa fina

Se realizó sobre una placa (5 × 6 cm) de gel de sílice tipo G, de 0,25 mm de espesor, utilizando como fase móvil acetato de etilo-alcohol isopropílico-agua (6: 3: 1) y como revelador hidróxido de potasio 10 %.¹¹

Identificación de glicósidos flavonoides

Prueba de Shinoda

Fueron colocados en un vidrio de reloj, 2 mL de extracto acuso liofilizado, se añadió una lámina de magnesio metálico y 5 gotas de HCL concentrado.¹¹

Identificación de taninos

Se midió 12 mL de extracto acuoso liofilizado, distribuyéndose en 6 tubos de ensayo y se procedió a realizar las pruebas de FeCl₃, gelatina, sub-acetato de plomo, clorhidrato de quinina, dicromato de potasio y agua de bromo.¹¹

Identificación de sesquiterpenlactonas

Cromatografía de capa fina

Se realizó sobre una placa (5 × 6 cm) de gel de sílice tipo G, de 0,25 mm de espesor, utilizando como fase móvil *n*-hexano-acetato de etilo (3:7) y como revelador, el reactivo de Baljet.¹¹

Animales de experimentación

Los animales empleados en el presente estudio fueron tratados conforme lo establecido en las guías Canadian Council on Animal Care (CCAC) para el cuidado y uso de animales de experimentación.¹² Para los ensayo se emplearon ratones NIH de ambos sexos, con peso corporal promedio inicial entre 19 y 24 g, con aproximadamente 1 mes una semana de nacidos, marcados con ácido pícrico para su identificación individual y mantenidos a una temperatura y humedad relativa controlada de 22 ± 2 °C y entre 50-60 % respectivamente, con un ciclo luz-oscuridad de 12/12 h. Todos los animales fueron examinados clínicamente antes de cada ensayo para certificar su estado de salud. La alimentación consistió en dieta standard a base de concentrado peletizado para roedor y agua a voluntad.

Toxicidad subaguda oral de 28 días

El ensayo se llevó a cabo según lo establecido por la Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) para este tipo de estudio a la dosis máxima de 2 000 mg/kg de peso corporal y un volumen de 0,2 mL.¹³ Se confeccionaron 4 grupos experimentales (2 grupos hembras y 2 grupos machos) a razón de 5 animales por grupo, de los cuales un grupos por sexo fue tratado con la sustancia en estudio (grupos tratamiento) y los dos restantes sirvieron de controles a los que se les administró agua destilada.

Observaciones, necropsias, hematología y estudio histopatológico

La sustancia se administró a los animales, en condiciones óptimas, todos y cada uno de los días, durante un período de 28 días. Diariamente se realizó la observación y chequeo clínico de los animales procurando determinar la aparición de síntomas compatibles con algunos parámetros de importancia toxicológica. Finalizados los 28 días del experimento, se procedió a la obtención de muestras sanguíneas del plexo ocular de cada uno de los animales. Posteriormente los animales fueron sacrificados por dislocación cervical para efectuar la necropsia y la extracción de los siguientes órganos: corazón, riñón, hígado, bazo, pulmón, intestino y estómago, los cuales fueron examinados macroscópicamente en cuanto a superficie, color, consistencia, tamaño y peso, para luego ser fijados en solución de formol al 10 %. Hígado y riñón fueron estudiados por medio de la técnica histopatológica clásica para bloques parafinados, cortadas en 5 µm y coloreadas con hematoxilina-eosina. De las muestras de sangre, se determinaron los valores hematológicos de hemoglobina, hematocrito, recuento de leucocitos y recuento total de eritrocitos.

Pruebas farmacológicas

Diseño experimental

Para cada una de las pruebas se confeccionaron 5 grupos experimentales por sexo: control negativo (agua destilada, vía oral, 0,2 mL), control positivo (diazepam, vía oral, 0,2 mL) y tres grupos tratamiento a razón de 100, 250 y 500 mg/kg de peso corporal (vía oral, 0,2 mL) y cada uno de los grupos formado por 10 animales seleccionados completamente al azar. En el caso de la prueba de inducción de sueño, se utilizó pentobarbital sódico a una dosis de 50 mg/kg peso corporal (vía intraperitoneal, 0,4 mL). 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 %. Las sustancias de ensayo fueron administradas una hora antes de cada prueba a excepción de diazepam (30 min antes). Así mismo, el acceso al agua y la comida se suspendió 2 horas antes de cada prueba.

Sueño inducido por pentobarbital

La prueba dio inicio con la administración de pentobarbital sódico para inducir sueño. Inmediatamente se registró el tiempo que el animal tardó en perder el equilibrio o período de latencia y el tiempo que tardó en recuperarlo o período de sueño.¹⁴

Enterramiento de esferas

Los ratones se colocaron individualmente en jaulas de policarbonato (43 × 27 × 15 cm), con 5 cm del material de cama (viruta fina de madera estéril) por 30 min (período de habituación). Finalizado este período y posterior al retiro del animal se colocaron sobre la viruta 20 esferas de vidrio equidistantes. La prueba inició cuando el animal es reintroducido en la misma jaula donde permanecerá por 30 min más.¹⁵ Finalizada la prueba, se retira el animal y se contabiliza aquellas canicas/esferas enterradas o cubiertas al menos en sus dos terceras partes con material de cama.¹⁶ Se ha sugerido que a mayor número de esferas enterradas, mayor nivel de ansiedad.¹⁷

Suelo agujereado

Para el ensayo se utilizó una plataforma de madera (50 × 50 cm) a una altura de 10 cm con 16 orificios de 2 cm de diámetro, equidistantes. El ensayo se inicia 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.¹⁷

El aumento en el número de exploraciones sugiere un menor estado de ansiedad o una mayor actividad exploratoria.¹⁸

Laberinto en cruz elevado

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) a una elevación del piso de 38,5 cm. Se colocó al ratón en el centro del laberinto con dirección hacia uno de los extremos abiertos y durante 5 min se cuantificó el tiempo que permanece en cada uno de los extremos, así como el número de entradas a cada uno de estos.^{14,17} La disminución de la actividad exploratoria es causada por el miedo a los espacios abiertos y el uso de compuestos ansiolíticos incrementa esta actividad,¹⁹ por lo que el efecto ansiolítico es acompañado por el aumento en la frecuencia y el tiempo de permanencia en las zonas abiertas.²⁰

Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos fueron estadísticamente evaluados con el software SPSS 18.0. La prueba de hipótesis incluye para los datos generados del ensayo de toxicidad, el análisis T de Student para muestras relacionadas y para muestras independientes; mientras que para los datos obtenidos de las pruebas farmacológicas 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 es significativa cuando $p < 0,05$, indicada mediante un asterisco (*). Todos los resultados son expresados como la Media \pm la Desviación Estándar (ensayo de toxicidad) y como la Media \pm Error Estándar de la Media (pruebas farmacológicas) de los grupos experimentales.

RESULTADOS

Pruebas fitoquímicas

Se realizaron tres pruebas químicas de precipitación para la identificación de los alcaloides presentes en el extracto acuoso de *E. berteriana*, usando los reactivos de Mayer, Wagner y Dragendorff. Se identificó la presencia de estos metabolitos secundarios al observar la presencia de precipitados de color blanco-amarillento, café y anaranjado, respectivamente. De la misma manera en cromatografía en capa fina se observó la presencia de alcaloides al rociar la placa con el reactivo de Dragendorff y observar 3 manchas de color naranja (R_f 0,23, 0,53 y 0,62, respectivamente). Además, la presencia de un anillo café-rojizo en la prueba de Salkowski y el color rojo en la prueba de Shinoda, confirman la presencia de triterpenos y flavonoides respectivamente. En cuanto a las pruebas de cromatografía de capa fina para identificar glicosidos cardiotónicos y antraquinónicos, así como sesquiterpenlactonas, no se presentaron manchas de color púrpura o violáceo, tampoco manchas de color rosado y rojo, ni manchas de color naranja, por lo que la presencia de estas sustancias es descartada. Por último, en la prueba para la identificación de taninos, no se observó presencia de color verde o azul en la prueba del $FeCl_3$ y hubo ausencia de precipitados en el resto de las pruebas, por lo que no se confirma la presencia de taninos.

Toxicidad subaguda oral de 28 días

Durante los chequeos clínicos que se realizaron diariamente a los animales tratados con el extracto acuoso ensayado, no se observaron alteraciones en los diferentes sistemas estudiados: piel, ojos y membranas mucosas, sistema respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, actividad somato motora y patrones de comportamiento. En la [tabla 1](#), se observa el comportamiento del peso corporal durante el tiempo de ensayo, en donde se puede apreciar que todos los grupos machos y hembras, aumentaron de peso a excepción del grupo hembras tratamiento que presentaron una disminución del 12,12 % al finalizar el ensayo. Respecto al estudio de órganos, no se reportaron alteraciones macroscópicas en cuanto a superficie, color, consistencia y tamaño de los órganos de los grupos experimentales. De la misma manera y tal como muestra en la [tabla 2](#), no se reportan diferencias significativas del peso de órganos entre los grupos tratados y los controles de ambos sexos; a excepción de un aumento significativo de los valores promedios de peso de riñón en machos tratados con la sustancia en estudio respecto a sus controles. Por otro lado, y una vez evaluados los tejidos hepático y renal en cortes histológicos, se determinó que no existieron evidencias de alteraciones microscópicas excepto en un caso de hígado del grupo tratamiento hembras en el que se observó un discreto infiltrado inflamatorio mixto focal inespecífico. En cuanto a los valores hematológicos y tal como se observa en la misma tabla, no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados con la sustancia de ensayo y sus respectivos controles.

Tabla 1. Variación de los valores promedios de peso corporal

Grupo	Peso Inicial			Peso Final			Aumento %			Sig. Bilateral
	Medi a	±	D.E	Medi a	±	D.E		±		
Hembras Control	20,110	±	1,630	22,250	±	1,790	10,810	±	6,250	
Hembras Tratamiento	20,340	±	1,380	17,910	±	2,380	- 12,120	±	8,170	0,009*
Machos Control	24,280	±	0,850	26,030	±	3,380	6,970	±	10,290	
Machos Tratamiento	26,340	±	0,460	27,380	±	0,810	3,930	±	1,750	0,632

Los valores se expresan como la media ± desviación estándar (D.E); aumento porcentual y la diferencia significativa (*) entre los grupos tratamiento respecto a sus controles cuando P < 0,05.

Pruebas farmacológicas

Los resultados obtenidos de la prueba de sueño inducido ([figura 1A](#)), muestran sin excepción alguna, diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedios de los grupos tratamiento y sus controles positivos. Lo mismo ocurre en cuanto al número de esferas escondidas ([figura 1B](#)). En cuanto a la prueba de suelo agujereado y tal como se observa en la [figura 2](#), en ambos sexos el número de exploraciones aumenta a medida que aumenta la concentración de la sustancia de estudio, alcanzando en machos niveles estadísticamente diferentes respecto al grupo tratado con agua destilada. En cuanto a la evaluación del número de entradas a las zonas abiertas y el tiempo de permanencia en estas zonas ([figuras](#)

3A y B), los resultados muestran una clara diferencia en el comportamiento entre machos y hembras. Por un lado, los valores promedios de los parámetros evaluados de hembras tratadas con el extracto acuoso de *E. berteriana* no muestran diferencias estadísticas significativas comparados con el grupo tratado con diazepam; no así lo observado en grupos machos en donde existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con la sustancia de estudio y el grupo tratado con el patrón diazepam.

Tabla 2. Valores promedio de peso de órganos internos y parámetros hematológicos

Órgano	Grupo	HEMBRAS				MACHOS			
		Media	±	D.E	Sig. Bilateral	Media	±	D.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	
Hemoglobina	Control	13,670	±	0,530	0,066	13,830	±	1,400	0,850
	Tratamiento	14,870	±	0,990		14,250	±	0,570	
Hematocrito	Control	41,000	±	1,580	0,066	41,500	±	4,200	0,851
	Tratamiento	44,600	±	2,970		42,750	±	1,710	
Neutrófilos %	Control	55,600	±	3,580	0,101	50,500	±	7,190	0,397
	Tratamiento	44,600	±	12,760		42,500	±	12,370	
Linfocitos %	Control	40,600	±	3,290	0,160	47,000	±	5,600	0,707
	Tratamiento	52,000	±	16,120		53,750	±	17,440	
RTE (mg/mm)	Control	61,900	±	2,820	0,066	62,250	±	6,300	0,851
	Tratamiento	66,900	±	4,450		64,130	±	2,560	

Los valores se expresan con la media ± desviación estándar (D.E) y la significancia de la diferencia (*) entre los grupos tratamiento respecto a sus controles cuando $P < 0,05$

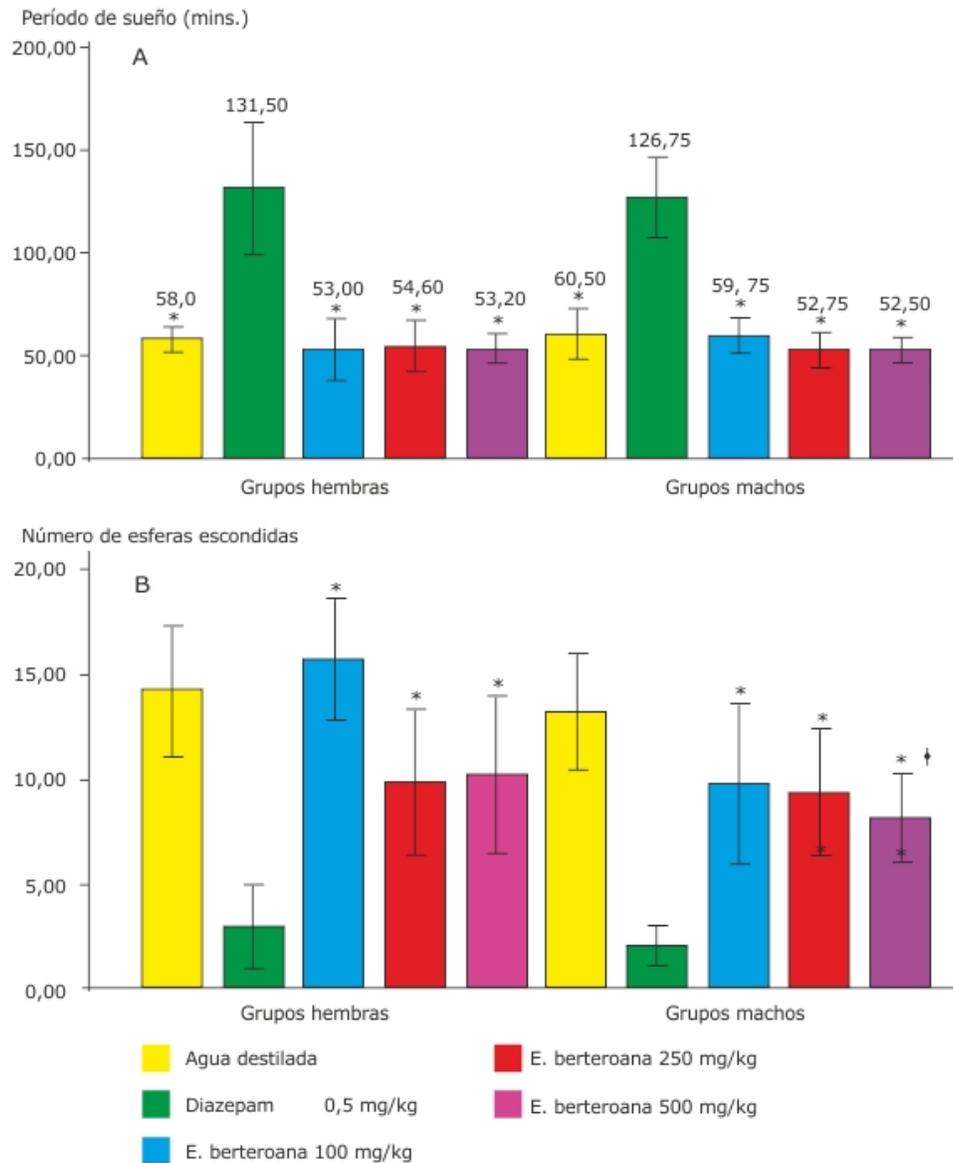


Fig.1. A. Período de sueño. **B.** Enterramiento de esferas. Comparación entre los grupos controles (agua destilada y diazepam) y los grupos tratamiento a dosis 100, 250 y 500 mg/kg para hembras y machos. Los datos se expresan como la media \pm el error estándar de la media (SEM); se consideró que la diferencia es significativa cuando $P < 0,05$. ANOVA/ Tukey-Kramer.

* Diferencia estadística entre grupos diazepam vs grupos tratados con sustancia de estudio.

† Diferencia estadística entre grupo agua destilada vs grupos tratados con sustancia de estudio.

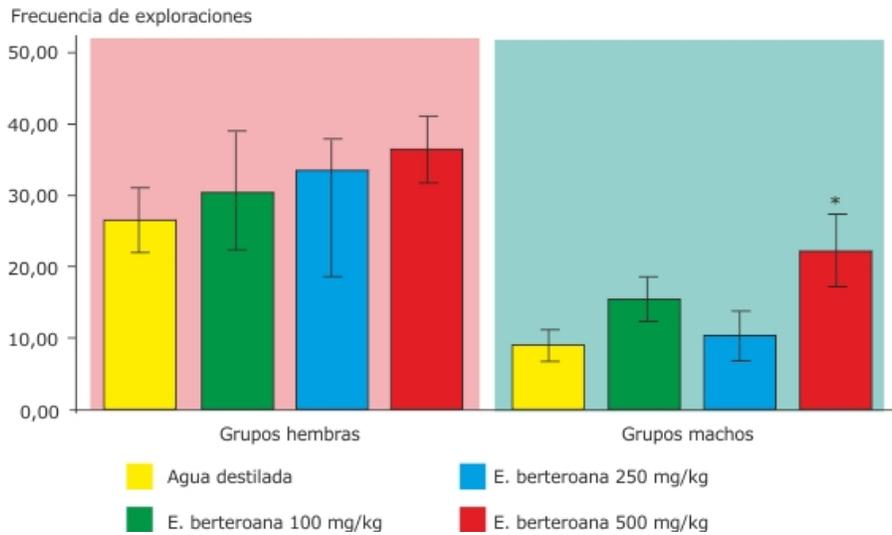


Fig. 2. Suelo agujereado. Comparación entre los grupos controles (agua destilada) y los grupos tratamiento a dosis 100, 250 y 500 mg/kg para hembras y machos. Los datos se expresan como la media ± el error estándar de la media (SEM); se consideró que la diferencia entre los grupos tratados y el grupo control negativo (agua destilada) es significativa (*) cuando P < 0,05. ANOVA/Tukey-Kramer.

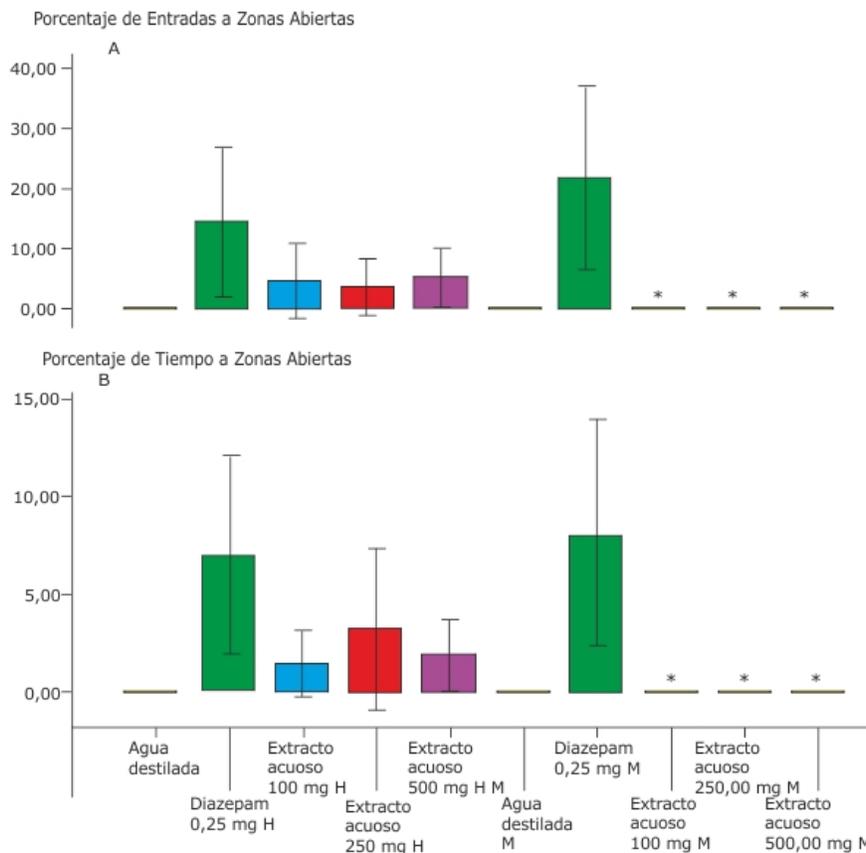


Fig. 3. Laberinto en cruz elevado. A. Porcentaje de entradas a zonas abiertas, B. Porcentaje de tiempo en zonas abiertas. Comparación entre los grupos controles (agua destilada y diazepam) y los grupos tratamiento a dosis 100, 250 y 500 mg/kg para hembras (H) y machos (M). Los datos se expresan como media ± SEM; se consideró que la diferencia entre los grupos tratados y el grupo control positivo es significativa (*) cuando P < 0,05. ANOVA/Tukey-Kramer.

DISCUSIÓN

Los resultados de las pruebas fitoquímicas, confirman que las flores de *E. berteriana* colectadas, contienen alcaloides, triterpenos y flavonoides en su composición química, lo que concuerda con los datos obtenidos de otros estudios con la misma especie.^{6,7} En cuanto a la disminución de peso observada en el grupo de hembras tratadas con la sustancia de estudio, puede deberse a efectos potencialmente tóxicos de esta especie vegetal puesto que la disminución de más del 10 % del peso corporal es considerada un indicativo de efectos adversos a la salud²¹ y podría explicarse por la movilización de reservas energéticas de los individuos para enfrentar la actividad metabólica incrementada que acompaña los procesos de desintoxicación.²²

El aumento de los valores promedio del peso de riñón en macho, aunque estadísticamente significativo, carece de significancia clínica por cuanto no corresponde ni a alteraciones macroscópicas, ni alteración alguna en los cortes histopatológicos de ese órgano. Respecto a la alteración observada en tejido hepático, no puede ser atribuido a la sustancia administrada durante el ensayo porque no se relaciona con ningún otro parámetro evaluado. Además la alteración fue observada en un único caso, la cual debe entenderse como una lesión espontánea propia del animal en cuestión y no debe ser considerado como un efecto de toxicidad. De igual manera, los valores hematológicos son indicadores del alcance y profundidad de los efectos adversos de una sustancia. Nuestros resultados no indican efectos adversos en la salud de los animales.²³ De acuerdo a todo lo anterior y según la clasificación de sustancias tóxicas de la OECD en su guía N° 423,²⁴ el extracto acuoso liofilizado de flores de *E. berteriana* utilizado en el presente trabajo, se clasifica dentro de la categoría N° 5 con una CL50 mayor de 2000 mg/kg, en cuanto que no representa alteraciones serias en el estado de salud general de los animales experimentales.

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. Las sustancias hipnóticas tienden a acortar el período de latencia y/o prolongar el período de sueño.²⁵ Los resultados obtenidos de esta prueba, demuestran que la sustancia de ensayo a las dosis administradas, a pesar de estar dotada químicamente de compuestos que ya fueron reportados como responsables de los efectos neurofarmacológicos de este género,^{9,10} no posee propiedades sedantes, por cuanto que estadísticamente existe una diferencia significativa con el tiempo de sueño inducido por diazepam; lo que podría deberse a una incompatibilidad entre el pentobarbital sódico y los compuestos químicos presentes en la sustancia de ensayo.²⁶

Pese a los resultados estadísticos obtenidos en cuanto al número de esferas ocultas por los grupos de animales tratados con la sustancia de ensayo, es evidente una disminución en el número de esferas ocultas a medida que la concentración del extracto acuoso liofilizado de las flores de *E. berteriana* aumenta, aproximándose a los resultados de la sustancia control positivo diazepam; por lo que no se descarta totalmente las propiedades ansiolíticas de *E. berteriana*. Además, el comportamiento observado en los animales tratados con *E. berteriana* 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 disminuya a medida que aumenta la concentración del extracto en estudio.¹⁷

En cuanto a la prueba de suelo agujerado, el aumento en el número de exploraciones según la concentración de la sustancia de ensayo respecto a su grupo control negativo, indica una tendencia a las propiedades ansiolíticas del extracto de *E. berteriana*. Además, se vio aumentado el número de cruces, exploraciones en zonas externas (orillas de la plataforma) y la caminata del ratón de manera desinhibida, conducta observada en todos los animales experimentales tratados con la sustancia 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.¹⁷

Por su parte, la prueba del laberinto en cruz elevado se basa en respuestas espontáneas de la conducta del ratón, utilizando estímulos naturales tales como el miedo a los espacios abiertos y miedo de caminar sobre una plataforma elevada y relativamente estrecha,¹⁷ conductas que no fueron observadas en los ratones hembras administradas con la sustancia de ensayo, por cuanto que se vio aumentado el número de entradas a zonas abiertas, resultados que concuerdan con estudios recientes en especies del género *Erythrina*,^{27,28,29,30} característico de las sustancias ansiolíticas.¹⁸ Esta diferencia de respuesta entre machos y hembras, podría deberse al papel protector de los estrógenos sobre el sistema dopaminérgico. 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 neurolépticos.³¹ Nuevamente nos encontramos frente a la actividad ansiolítica de la sustancia de ensayo, puesto que provoca un aumento de la conducta menos temerosa a las alturas y a los espacios abiertos principalmente en hembras.

En consideración del análisis realizado, podemos concluir que los resultados de la presente investigación demuestran que no existe un efecto sedante, pero sí un efecto ansiolítico ligeramente efectivo del extracto acuoso de las flores de *E. berteriana* en comparación con diazepam como fármaco de referencia, lo que puede ser atribuido a la presencia principalmente de alcaloides y flavonoides en la sustancia de estudio.^{6,32}

AGRADECIMIENTOS

Los investigadores agradecen a Nuria Torres por su indispensable colaboración en el análisis estadístico de los resultados. A la MSc. Nohemy Ventura por la identificación taxonómica de la muestra vegetal. A José Mejía y Luis Gómez, por su colaboración incondicional en la realización de las pruebas farmacológicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS. Pautas Generales para las Metodologías de Investigación y Evaluación de Medicina Tradicional. WHO/EDM/TRM/ 2000;1. Ginebra, Suiza.
2. Merino MH. Contribución al conocimiento etnobotánico en San Luis La Herradura, Departamento de La Paz, El Salvador. [Tesis de Licenciada en Biología]. Universidad de El Salvador, El Salvador; 1998.

3. OMS. Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional. 2002-2005. WHO/EDM/TRM/ 2002;1. Ginebra, Suiza.
4. OMS. El informe sobre la salud en el mundo 2001: Salud mental: Nuevo entendimiento, nueva esperanza. Ginebra, Organización Mundial de la Salud; 2001.
5. Hosman C, Jané-Llopis E. Retos políticos 2: salud mental. En: Unión Internacional para la Promoción de Salud y Educación. La evidencia de la efectividad de la promoción de la salud: forjando la salud pública en una nueva Europa. Bruselas, ECSC-EC-EAEC. 1999; 29-41.
6. Pino S, Prieto S, Perez M, Molina J. Género *Erythrina*: Fuente de Metabolitos Secundarios con Actividad Biológica. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 2004; 23(2)252-558.
7. Corado MJ, Escobar SA. Extracción y determinación de la presencia de alcaloides en flores del árbol de pito (*Erythrina berteroana*). [Trabajo de graduación para optar al grado de Técnico en Laboratorio Químico]. Escuela Especializada en Ingeniería, ITCA-FEPADE, 2013.
8. Tanaka H, Hattori H, Tanaka T, Sakai E, Tanaka N, Kulkarni A, *et al.* A new Erythrina alkaloid from *Erythrina herbacea*. *J Nat Med*. 2008;62(2):228-31.
9. Flausino OA Jr, Pereira AM, da Silva Bolzani V, Nunes-de-Souza RL. Effects of erythrinian alkaloids isolated from *Erythrina mulungu* (Papilionaceae) in mice submitted to animal models of anxiety. *Biol Pharm Bull*. 2007;30(2):375-8.
10. Parsons AF, Palframan MJ. *Erythrina* and related alkaloids. *Alkaloids Chem. Biol*. 2010;68:39-81.
11. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda edición, Fondo Editorial, Perú; 1994. p. 1-300.
12. CCAC. Guide for the care and use of laboratory animals. Canadian Council on Animal Care, Ottawa, Canada; 1998.
13. OECD. Guideline for the testing of chemicals N° 407. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents; 1995.
14. Ariza SY, Rueda DC, Rincon VJ, Linares EL, Guerrero MF. Efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central inducidos por cumarina, aislada de *Hygrophilatytha* Leonard. *Vitae*. 2007; 14(2):51-58.
15. Homma C, Yamada K. Physical Properties of Bedding Materials Determine the Marble Burying Behavior of Mice (C57BL/6J). *The Open Behavioral Science Journal*. 2009;3:34-39.
16. Broekkamp CL, Rijk HW, Joly-Gelouin D, Lloyd FL. Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. *Eur J Pharmacol*. 1986;126(3):223-229.
17. Rejon-Orantes J, Placer D, Rolan G. Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas. *Univ. Méd. Bogotá (Colombia)*. 2011;52(1):78-89.

18. File SE, Pellos S. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the hole board. *Brit J Pharmacol.* 1985;86(3):729-735.
19. 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;24(3):365-376.
20. Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther.* 1990;46(3):321-340.
21. Ramesh T, Lee K, Kim S. Acute oral toxicity study of *Asiasari radix* extract in mice. *International Journal of Toxicology.* 2007;26(3):247-251.
22. Infante JF, Sifontes S, Perez P, Gonzalez P, Muñoz E, Marrero O, *et al.* Toxicología de VA-DIFTET por aplicación a dosis única en ratones. *Caccimonitor.* 2000;9(2):1-6.
23. Gonzalez Y, Scull CI, Bada AM, Fuentes D, Gonzalez B, Argueta ME, *et al.* Ensayo de toxicidad a dosis repetidas durante 28 días del extracto acuoso de *Cecropia peltata* L. (yagruma) en ratas Cenp: SPRD. *Rev Cubana Plant Med.* [revista en la Internet]. 2006 Jun [citado 2013 Agosto 06]; 11(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962006000200005&lng=es
24. OECD. Guideline for testing of chemicals N° 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method; 2001.
25. Carlini EA, Contar J de DP, Silvia Filho AR, Da Silveira Filho NG, Frochtengarten ML, Bueno OF. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *J Ethnopharmacol.* 1986;17(1):37-64
26. Barrios Valenzuela AC. 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. [Tesis Licenciatura de Química Farmacéutica]. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos, Guatemala; 2007.
27. Nagaraja TS, Mahmood R, Krishna V, Thippeswamy BS, Veerapur VP. Evaluation of anxiolytic effect of *Erythrina mysorensis* Gamb. in mice. *Indian J Pharmacol.* 2012;44(4):489-92.
28. Raupp IM, Sereniki A, Virtuoso S, Ghislandi C, Cavalcanti E, Silva EL, *et al.* Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. *J Ethnopharmacol.* 2008;118(2):295-9.
29. Ribeiro MD, Onusic GM, Poltronieri SC, Viana MB. Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(2):263-70.
30. Vasconcelos SM, Macedo DS, de Melo CT, Paiva Monteiro A, Rodrigues AC, Silveira ER, *et al.* Central activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. *J Pharm Pharmacol.* 2004;56(3):389-93.

31. Arenas MC, Parra A, Simon VM. Diferencias de género en los efectos del haloperidol y otros neurolépticos. *Psicothema*. 1995;7(2):327-338.
32. Rodríguez-Landa JF, Hernández-López F, Saavedra M. Involvement of Estrogen Receptors in the Anxiolytic-Like Effect of Phytoestrogen Genistein in Rats with 12-Week Postovariectomy. *Pharmacology & Pharmacy*. 2012;3:439-446.

Recibido: 8 de octubre de 2013.
Aprobado: 14 de octubre de 2014.

Lic. Miguel Moreno.
Correo electrónico: miguel.moreno@ues.edu.sv