

**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**



**“DETERMINACIÓN DEL EFECTO SEDANTE Y ANSIOLÍTICO DEL EXTRACTO  
METANÓLICO DE *Erythrina edulis* triana ex micheli EN RATONES”**

**Trabajo de Titulación previo a la obtención  
del título de Bioquímico Farmacéutico**

**Autores:**

Josué Sarmiento Pacurucu

C.I. 0104017835

Daniela Salomé Zea Izquierdo

C.I. 0302627690

**Directora:**

Dra. Eugenia Peñaherrera Wilches

C.I. 0102452075

**Asesora:**

Dra. Mariana Elizabeth Saá Cruz

C.I. 0102654522

Cuenca – Ecuador

2018



## RESUMEN

El presente trabajo es un estudio experimental cuyo objetivo fue investigar la actividad sedante, ansiolítica y la toxicidad del extracto metanólico de las hojas de *Erythrina edulis*. La determinación del grado de toxicidad se realizó en *Artemia salina*, dando como resultado una toxicidad nula y una concentración letal 50 de 16,57mg/mL. El extracto fue preparado en concentraciones de 125, 250 y 500mg/Kg y se administraron vía intraperitoneal en ratones swiss CD1 tanto para las pruebas de sedación como para las de ansiedad empleándose diazepam (1mg/Kg) como fármaco control. Para la actividad sedante se usó la prueba potenciación del sueño con pentobarbital y la prueba de tracción determinándose que el extracto no posee actividad sedante en ninguna de las dosis administradas, sin embargo, se observó la posibilidad de un efecto contrario; una activación del sistema nervioso central. La actividad ansiolítica fue evaluada mediante la prueba de campo abierto y la prueba de laberinto elevado en cruz, donde se observaron comportamientos propios de un ratón con niveles bajos de ansiedad. En conjunto, los resultados sugieren que el extracto en estudio puede tener una actividad ansiolítica no sedante apoyando su uso tradicional, sin embargo, sus respuestas no son dosis dependiente y se desconoce su mecanismo de acción.

Para el análisis estadístico de estas pruebas se usó ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Tukey de comparaciones múltiples, mientras que para la determinación del grado de toxicidad se usó análisis de regresión lineal usando análisis Probyt de Finney.

**Palabras Clave:** *Erythrina edulis*, extracto metanólico, sedación, ansiedad, ratones.



## ABSTRACT

The present work is an experimental study designed to investigate the sedative, anxiolytic activity and the toxicity of the methanol extract of the leaves of *Erythrina edulis*. Toxicity assay was performed in *Artemia salina*, resulting in a lethal concentration 50 of 16,57mg/mL corresponding to zero toxicity. The extract was prepared in different concentrations; 125, 250 and 500mg/kg and was administered intraperitoneally in Swiss CD1 mice for both sedation and anxiety tests using diazepam (1mg/kg) as a control drug. The sleep enhancement test with pentobarbital and the traction test were used for the sedative activity. Results showed that the extract does not possess sedative activity in any of the administered doses, however, the possibility of an opposite effect was observed; an activation of the central nervous system. The anxiolytic activity was evaluated by the open field test and the elevated plus maze test, where a behavior with a low level of anxiety was observed. Altogether, the results suggest that the extract in the study may have a non-sedative anxiolytic activity which supports traditional use, however, its responses are not dose-dependent and its mechanism of action is unknown.

For the statistical analysis of these tests, one-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test of multiple comparison were used, while linear regression analysis using Probyt analysis was used to determinate the degree of toxicity

**Key words:** *Erythrina edulis*, methanol extract, sedation, anxiety, mice.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	3
LISTA DE TABLAS.....	7
LISTA DE FIGURAS .....	10
AGRADECIMIENTO.....	18
INTRODUCCIÓN .....	19
CAPÍTULO I.....	21
MARCO TEÓRICO .....	21
1.1.    DEFINICIONES.....	21
1.1.1.    Fitoterapia.....	21
1.1.2.    Planta medicinal y droga vegetal.....	21
1.2.    Plantas como tratamiento alternativo para la ansiedad y sedación .....	21
1.3.    Descripción botánica y farmacológica de la especie vegetal estudiada .....	22
1.3.1.    Género <i>Erythrina</i> .....	22
1.3.2. <i>Erythrina edulis</i> Triana ex Micheli.....	22
1.4.    EFECTO SEDANTE.....	24
1.4.1.    Generalidades.....	24
1.4.2.    Fases del sueño.....	25
1.4.3.    Fisiología del sueño .....	25
1.4.4.    Trastornos del sueño .....	26
1.4.6.    Insomnio .....	28
1.5.    Ansiedad.....	33
1.5.1.    Síntomas.....	33
1.5.2.    Clasificación.....	34
1.5.3.    Neuroanatomía y la ansiedad .....	35
1.5.4.    Neuroquímica del miedo y la ansiedad.....	36



1.6. Benzodicepinas (BZD) .....	38
1.6.1. Mecanismo de acción: .....	38
1.6.2. Reacciones adversas y seguridad de las Benzodicepinas .....	39
1.6.3. Diazepam.....	39
1.6.3.2. Metabolismo y excreción .....	40
1.7. Animales de experimentación .....	40
1.7.1. Modelos biológicos para la evaluación del efecto farmacológico.....	40
1.8. PRUEBAS PARA LA EVALUACION DEL EFECTO SEDANTE .....	42
1.8.1. Potenciación del sueño con Pentobarbital sódico.....	42
1.8.2. Prueba de Tracción.....	42
1.9. PRUEBAS PARA LA EVALUACION DEL EFECTO ANSIOLÍTICO .....	42
1.9.1. Campo Abierto .....	42
1.9.2. Laberinto elevado en cruz .....	42
CAPITULO 2 .....	43
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
2.1. Tipo de investigación .....	43
2.2. Localización.....	43
2.3. MATERIALES.....	43
2.4. MÉTODOS .....	44
CAPITULO 3 .....	58
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	58
2.1. Rendimiento del extracto metanólico de <i>Erythrina edulis</i> .....	58
2.2. Marcha fitoquímica en Cromatografía de Capa Fina (TLC).....	58
2.3. TOXICIDAD DEL EXTRACTO METANÓLICO DE HOJAS DE <i>Erythrina edulis</i> EN ARTEMIA SALINA.....	61
2.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SEDANTE .....	63
2.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA .....	68



CAPITULO 4 .....	76
4.1. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	76
Bibliografía .....	77
ANEXOS .....	85
Anexo 1. <i>Erythrina edulis</i> Triana ex Micheli .....	85
Anexo 2. Caracterización Botánica de la planta medicinal <i>Erythrina edulis</i> Triana ex Michelli realizada en el Herbario de la Universidad del Azuay .....	86
Anexo 3. Ficha de <i>Erythrina edulis</i> que se puede encontrar en el repositorio digital del Herbario de la Universidad del Azuay bajo el número 11980 .....	87
Anexo 4. Procesamiento del material vegetal para la obtención del extracto .....	88
Anexo 5. Imágenes de TLC de extracto metanólico de hojas de <i>Erythrina edulis</i> .....	92
Anexo 6. Toxicidad con Artemia Salina.....	98
Anexo 8. Ensayos con Ratones Swiss CD1 .....	108



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Información botánica de <i>Erythrina edulis</i> .....	22
<b>Tabla 2:</b> Neurotransmisores en el ciclo sueño-vigilia.....	26
<b>Tabla 3:</b> Clasificación de los trastornos del sueño ICSD-3.....	27
<b>Tabla 4:</b> Recomendaciones para una buena higiene de sueño.....	31
<b>Tabla 5:</b> Terapias psicológicas y conductuales para el insomnio en orden de evidencia científica.....	31
<b>Tabla 6:</b> <i>Screening Fitoquímico de Erythrina edulis</i> .....	50
<b>Tabla 7:</b> Marcha Fitoquímica en TLC de extracto metanólico de <i>Erythrina edulis</i> . .....	59
<b>Tabla 8:</b> Toxicidad del extracto metanólico de hojas de <i>Erythrina edulis</i> en <i>Artemia Salina</i> aplicando análisis Probit.....	61
<b>Tabla 9:</b> CL50 del extracto metanólico de hojas de <i>Erythrina edulis</i> en <i>Artemia salina</i> ....	61
<b>Tabla 10:</b> Efecto del extracto metanólico de hojas de <i>Erythrina edulis</i> en la prueba de inducción del sueño con Pentobarbital sódico.....	63
<b>Tabla 11:</b> Efecto del extracto metanólico de hojas de <i>Erythrina edulis</i> en la prueba de Tracción. ....	66
<b>Tabla 12:</b> Efecto del extracto metanólico de hojas de <i>Erythrina edulis</i> en la prueba de Campo abierto.....	69
<b>Tabla 13:</b> Efecto del extracto metanólico de hojas de <i>Erythrina edulis</i> en la prueba de Laberinto en cruz elevado .....	73
<b>Tabla 14:</b> Cromatogramas de Alcaloides en TLC del extracto metanólico de hojas de <i>Erythrina edulis</i> .....	92
<b>Tabla 15:</b> Test ANOVA para concentración letal 50 del extracto metanólico de hojas <i>Erythrina edulis</i> en <i>Artemia salina</i> .....	99
<b>Tabla 16:</b> Test ANOVA para tiempo de latencia en la prueba de inducción del sueño con Pentobarbital sódico.....	99
<b>Tabla 17:</b> Test ANOVA para tiempo de sueño en la prueba de inducción del sueño con Pentobarbital sódico.....	99
<b>Tabla 18:</b> Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de tiempo de latencia en la prueba de inducción del sueño con Pentobarbital sódico .....	99
<b>Tabla 19:</b> Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de tiempo de sueño en la prueba de inducción del sueño con Pentobarbital sódico .....	100



<b>Tabla 20:</b> Test ANOVA para tiempo de restablecimiento a los 30 minutos en la prueba de tracción .....	100
<b>Tabla 21:</b> Test ANOVA para tiempo de restablecimiento a los 60 minutos en la prueba de tracción .....	100
<b>Tabla 22:</b> Test ANOVA para tiempo de restablecimiento a los 90 minutos en la prueba de tracción .....	101
<b>Tabla 23:</b> Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de tiempo de restablecimiento a los 30 minutos en la prueba de tracción.....	101
<b>Tabla 24:</b> Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de tiempo de restablecimiento a los 60 minutos en la prueba de tracción.....	101
<b>Tabla 25:</b> Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de tiempo de restablecimiento a los 60 minutos en la prueba de tracción.....	102
<b>Tabla 26:</b> Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de tiempo de restablecimiento a los 90 minutos en la prueba de tracción.....	102
<b>Tabla 27:</b> Test ANOVA para número de líneas cruzadas en la prueba de campo abierto .....	102
<b>Tabla 28:</b> Test ANOVA para número de entradas al cuadrante central en la prueba de campo abierto .....	102
<b>Tabla 29:</b> Test ANOVA para tiempo de permanencia en cuadrante interno en la prueba de campo abierto .....	103
<b>Tabla 30:</b> Test ANOVA para rearing asistido en la prueba de campo abierto.....	103
<b>Tabla 31:</b> Test ANOVA para rearing no asistido en la prueba de campo abierto.....	103
<b>Tabla 32:</b> Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de número de líneas cruzadas en la prueba de campo abierto.....	103
<b>Tabla 33:</b> Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de número de entradas al cuadrante central en la prueba de campo abierto .....	104
<b>Tabla 34:</b> Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de tiempo de permanencia en cuadrante interno en la prueba de campo abierto .....	104
<b>Tabla 35:</b> Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de rearing asistido en la prueba de campo abierto.....	104
<b>Tabla 36:</b> Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de rearing no asistido en la prueba de campo abierto.....	105



**Tabla 37:** Test ANOVA para número de entradas a brazos abiertos en la prueba de Laberinto en cruz elevado ..... 105

**Tabla 38:**..... 105

**Tabla 39:**Test ANOVA para número de entradas a brazos cerrados en la prueba de Laberinto en cruz elevado ..... 105

**Tabla 40:** Test ANOVA para tiempo de permanencia en brazos abiertos en la prueba de Laberinto en cruz elevado ..... 105

**Tabla 41:** Test ANOVA para tiempo de permanencia en brazos cerrados en la prueba de Laberinto en cruz elevado ..... 106

**Tabla 42:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de número de entradas en brazos abiertos en la prueba de laberinto elevado en cruz..... 106

**Tabla 43:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de número de entradas en brazos cerrados en la prueba de laberinto elevado en cruz ..... 106

**Tabla 44:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de tiempo de permanencia en brazos abiertos en la prueba de laberinto elevado en cruz ..... 106

**Tabla 45:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de tiempo de permanencia en brazos cerrados en la prueba de laberinto elevado en cruz ..... 107



## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig. 1:</b> Estructura química del diazepam. ....	40
<b>Fig. 2:</b> Agotamiento de la droga vista a 366nm. ....	47
<b>Fig. 3:</b> Obtención de CL50, CL1 y CL99 por interpolación de la relación lineal de Probit y Log10 de la concentración del extracto. ....	62
<b>Fig. 4:</b> Tiempo de latencia del ensayo de potenciación del sueño con pentobarbital sódico. ....	64
<b>Fig. 5:</b> Tiempo de sueño del ensayo de potenciación del sueño con pentobarbital sódico. ....	65
<b>Fig. 6:</b> Prueba de Tracción a los 30 minutos de inyección i.p. ....	67
<b>Fig. 7:</b> Prueba de Tracción a los 60 minutos de inyección i.p. ....	67
<b>Fig. 8:</b> Prueba de Tracción a los 90 minutos de inyección i.p. ....	68
<b>Fig. 9:</b> Número de líneas Cruzadas en campo abierto. ....	71
<b>Fig. 10:</b> (A) Número de entradas al cuadrante central en campo abierto. (B) Tiempo de permanencia en cuadrante interno en campo abierto. ....	72
<b>Fig. 11:</b> (A) Número de rearings asistidos en campo abierto. (B) Número de rearings no asistidos en campo abierto. ....	72
<b>Fig. 12:</b> Número de entradas en brazos abiertos de laberinto elevado en cruz. ....	74
<b>Fig. 13:</b> Número de entradas en brazos cerrados de laberinto elevado en cruz. ....	74
<b>Fig. 14:</b> Tiempo de permanencia en brazos de laberinto elevado en cruz (A) Brazos abiertos (B) Brazos cerrados. ....	75
<b>Fig. 15:</b> Árbol de <i>Erythrina edulis</i> localizado en el cantón Chordeleg de la Provincia del Azuay. ....	85
<b>Fig. 16:</b> Flor de <i>Erythrina edulis</i> . ....	85
<b>Fig. 17:</b> Selección de hojas de <i>E. edulis</i> . ....	88
<b>Fig. 18:</b> Lavado de las hojas de <i>E. edulis</i> . ....	88
<b>Fig. 19:</b> Reposo de las hojas de <i>E. edulis</i> en agua destilada. ....	88
<b>Fig. 20:</b> Ecurrido de hojas de <i>E. edulis</i> en bandejas metálicas. ....	88
<b>Fig. 21:</b> Trituración de las hojas de <i>E. edulis</i> . ....	89
<b>Fig. 22:</b> Triturado de las hojas de <i>E. edulis</i> . ....	89
<b>Fig. 23:</b> Pesaje de droga seca. ....	89
<b>Fig. 24:</b> Ensamblaje de percolador. ....	89
<b>Fig. 25:</b> Percoladores armados previo reposo por 24 horas. ....	89



<b>Fig. 26:</b> Proceso de percolacion de la droga .....	90
<b>Fig. 27:</b> Concentración del extracto fluido en Rotavapor Heidolph Laborota 4000 Efficient HB digital.....	90
<b>Fig. 28:</b> Sonicacion de extracto concentrado. ....	90
<b>Fig. 29:</b> Eliminación del solvente mediante nitrógeno en el baño ultrasónico.....	90
<b>Fig. 30:</b> Congelamiento de extracto previo a Liofilizacion.....	90
<b>Fig. 31:</b> Ensamblaje de Liofilizador Labconco Free zone 2.5 .....	90
<b>Fig. 32:</b> Extracto metanólico seco obtenido por liofilizacion .....	91
<b>Fig. 33:</b> Dosificacion de extracto en tubos de vidrio .....	91
<b>Fig. 34:</b> Visualización de Flavonoides con revelador de Productos naturales en una longitud de onda de 366nm.....	95
<b>Fig. 35:</b> Visualización de Antraquinonas con revelador de Productos naturales en una longitud de onda de 366nm.....	95
<b>Fig. 36:</b> Visualización de Terpenos con revelador de Anizaldehido y fase móvil de Tolueno: Cloroformo: Etanol (40:40:10) en luz visible .....	95
<b>Fig. 37:</b> Visualización de Terpenos con revelador de Anizaldehido y fase móvil de Tolueno: Acetato de Etilo (85:15) en luz visible .....	95
<b>Fig. 38:</b> Visualización de Saponinas con revelador de Anizaldehido y fase móvil de Cloroformo: Ácido acético: Metanol: Agua (64:32:12:8) a 366nm.....	96
<b>Fig. 39:</b> Visualización de Saponinas con revelador de Anizaldehido y fase móvil de Cloroformo: Ácido acético: Metanol: Agua (64:32:12:8) en luz visible .....	96
<b>Fig. 40:</b> Visualización de Saponinas con revelador de Anizaldehido y fase móvil de Cloroformo: Ácido acético: Metanol: Agua (64:32:12:8) en luz visible .....	96
<b>Fig. 41:</b> Visualización de Saponinas con revelador de Anizaldehido y fase móvil de Cloroformo: Ácido acético: Metanol: Agua (64:32:12:8) en luz visible .....	96
<b>Fig. 42:</b> Visualización de Taninos con revelador Berlín y fase móvil de Tolueno: Acetona: Ácido Fórmico (60: 60:10) en luz visible .....	97
<b>Fig. 43:</b> Eclosión de los quistes de Artemia Salina.....	98
<b>Fig. 44:</b> Recolección de nauplios .....	98
<b>Fig. 45:</b> Distribución de nauplios en los pocillos.....	98
<b>Fig. 46:</b> Placa con diluciones del extracto .....	98
<b>Fig. 47:</b> Acondicionamiento de los ratones en jaulas .....	108
<b>Fig. 48:</b> Inyeccion intraperitoneal del extracto .....	108



**Fig. 49:** Prueba de Tracción..... 108  
**Fig. 50:** Prueba de Campo Abierto..... 108  
**Fig. 51:** Laberinto elevado en cruz..... 109



Universidad de Cuenca  
Cláusula de Licencia y Autorización para Publicación en el Repositorio Institucional

---

Josué Sarmiento Pacurucu, autor del trabajo de titulación "**Determinación del efecto sedante y ansiolítico de un extracto metanólico de *Erythrina edulis Triana ex Micheli* en ratones**", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de **Bioquímico Farmacéutico**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, febrero de 2018

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Josué Sarmiento Pacurucu".

---

Josué Sarmiento Pacurucu

C.I. 0104017835



Universidad de Cuenca  
Cláusula de Licencia y Autorización para Publicación en el Repositorio Institucional

---

Daniela Salomé Zea Izquierdo, autora del trabajo de titulación “**Determinación del efecto sedante y ansiolítico de un extracto metanólico de *Erythrina edulis Triana ex Micheli* en ratones**”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de **Bioquímica Farmacéutica**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, febrero de 2018

---

Daniela Salomé Zea Izquierdo

C.I. 0302627690



Universidad de Cuenca  
Cláusula Propiedad Intelectual

---

Josué Sarmiento Pacurucu, autor del trabajo de titulación "**Determinación del efecto sedante y ansiolítico de un extracto metanólico de *Erythrina edulis Triana ex Micheli* en ratones**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, febrero de 2018

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Josué Sarmiento Pacurucu".

Josué Sarmiento Pacurucu

C.I. 0104017835



Universidad de Cuenca  
Cláusula Propiedad Intelectual

---

Daniela Salomé Zea Izquierdo, autora del trabajo de titulación "**Determinación del efecto sedante y ansiolítico de un extracto metanólico de *Erythrina edulis Triana ex Micheli* en ratones**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, febrero de 2018

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a blue oval. The signature appears to be "salomezea".

---

Daniela Salomé Zea Izquierdo

C.I. 0302627690



## DEDICATORIA

A mi mamá, por ser quien ha estado conmigo en cada paso que he dado, siendo mi ejemplo y fortaleza, a mi hermano por su apoyo y cariño incondicional, a mi abuelita María Teresa por todas sus enseñanzas y amor. Y por último a mi tía Tere quién siempre está a mi lado ayudándome y alentándome.

Salomé

A mi madrecita y a mi padre por guiarme por el camino de la rectitud y alejarme de la mediocridad. A los animales de experimentación que han entregado su vida a la ciencia. A todos los que se aventuran al descubrimiento y crecimiento científico. A aquellos con espíritu ambicioso que al ordenar un bolón lo piden mixto.

Josué



## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por permitirnos llegar a este punto, por poner en nuestro trayecto a personas extraordinarias que nos ayudan a crecer día a día.

Agradecemos a la Universidad de Cuenca por habernos acogido y dado la oportunidad de culminar una de nuestras metas, por permitirnos crecer como personas e iniciarnos como investigadores.

Agradecemos de manera muy especial a nuestra directora Dra. Eugenia Peñaherrera y nuestra asesora Dra. Mariana Súa por brindarnos los conocimientos y guías necesarias para adentrarnos al mundo de la investigación, por habernos brindado la comprensión y el aliento necesario para la realización del trabajo final.

Agradecemos infinitamente al equipo VLIR a Dra. Isabel Wilches por habernos dado la apertura y acogida, a Dra. Nancy Cuzco a Dr. Fabian León por guiarnos y ayudarnos a resolver cada una de nuestras dudas y compartirnos de su conocimiento. A Ing. Vladimiro Tobar por su valiosa ayuda en el análisis estadístico del proyecto.

A BQF. Diana Morales y BQF. Jessica Calle por su incondicional apoyo y preocupación, por la confianza depositada en nosotros.,

A Dra. Rafaela Ansaloni por su ayuda inmediata en la identificación de la especie vegetal.

También extendemos nuestra gratitud al Instituto Nacional de Investigación en salud INSPI, quienes hicieron posible el proyecto al proveernos de los animales de experimentación, a Dr. José Pico por brindarnos las facilidades en este proceso.

A nuestros padres y hermanos por su comprensión apoyo y dedicación.

Finalmente, agradecemos a todos los animales de experimentación que permiten el desarrollo y avance de la ciencia y la medicina, sin ellos nuestra realidad sería distinta.

Gracias totales

Josué y Salomé



## INTRODUCCIÓN

Debido a la natural curiosidad y necesidad, el ser humano ha utilizado desde sus inicios plantas o partes de ellas para tratar sus dolencias, descubriendo gradualmente tanto sus potenciales usos, como su toxicidad. Todos estos conocimientos se iban pasando a través de generaciones, y aún en la actualidad son usados de manera muy aceptada por parte de la humanidad (Lluís Berdonces, 2003).

Al ser el Ecuador un país multiétnico, pluricultural y biodiverso, la medicina ancestral está arraigado en sus habitantes, siendo la fitoterapia y las “limpias” prácticas muy usadas, en las que se emplean diferentes plantas medicinales, su savia y/o extractos simples para el tratamiento de varias dolencias. Gran parte de la comunidad usa las plantas medicinales como primera línea en el tratamiento de dolencias, en muchos casos bajo un régimen de automedicación debido al consejo de conocidos con la creencia de que al ser un producto natural es inocuo, cosa que puede ser errónea. Para el año 2014, la Dirección de Salud del Azuay, había registrado a 315 mujeres que hacen poco a poco uso prioritario a la medicina ancestral, y para el año 2016 existían 350 hombres y mujeres que aplicaban la práctica, lo cual corrobora lo anteriormente descrito (Cáceres, 2016; Lituma, 2014).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha emitido una estrategia sobre la medicina tradicional, con la finalidad de fortalecer esta práctica y promover su uso, la misma que consiste en apoyar investigaciones que demuestren que su utilización es segura y eficaz, para su uso como tratamiento alternativo (OMS, 2013; Cañigueral, Dellacassa, & Bandon, 2003; Lluís Berdonces, 2003).

Hoy en día al vivir en un mundo lleno de problemas sociales, económicos y personales es muy común escuchar hablar de trastornos relacionados con el Sistema Nervioso (SN), de entre la gran variedad de trastornos psicosomáticos que existen los más comunes son la ansiedad y trastornos en el sueño. La presencia de estos trastornos ha incrementado en la población durante los últimos años, por lo que es necesario contar con tratamientos eficaces para aliviarlos y disminuirlos que al mismo tiempo que tengan efectos adversos escasos o inexistentes.

El tratamiento farmacológico de mayor uso para ambos trastornos son las Benzodiacepinas, de estas la más utilizada es el Diazepam, un agonista no selectivo del receptor del ácido gamaaminobutírico A (GABA-A). Al activar estos receptores produce



una disminución en la actividad neuronal lo que se traduce en una acción tranquilizante (ansiolítica), miorrelajante, anticonvulsivante e inductora del sueño (Steimer, 2002; Goddard & Charney, 1997). A pesar de que este fármaco es efectivo, tiene varias reacciones adversas molestas para el paciente entre las que destacan sedación diurna, relajación muscular, deterioro cognitivo y dependencia. Lo cual demanda tener tratamientos alternativos, que puede ser brindados por plantas y hierbas medicinales.

La exploración de nuevas sustancias que tengan efecto ansiolítico y/o sedante con buena eficacia y pocos efectos adversos es un reto, resultando necesario investigar las especies vegetales con el fin de encontrar grupos químicos activos y posteriormente principios activos útiles. Una de las plantas que ha sido usadas en forma empírica para el tratamiento de los nervios en el Ecuador es el “Cañaro”, de nombre científico *Erythrina edulis* (Rios, Koziol, Borgtoft Pedersen, & Granda, 2007). Esta planta tiene múltiples usos reportados y se tiene evidencia de los beneficios obtenidos de sus hojas, frutos y semillas (Pino, Prieto, Pérez, & Molina, 2004). Sin embargo, no existen estudios que demuestren los potenciales usos de la planta para tratar el nerviosismo y ansiedad como describe la información etnobotánica.

Análisis fitoquímicos realizados sobre el género *Erythrina* demuestran la presencia de alcaloides, flavonoides y proteoides (Pino, Prieto, Pérez, & Molina, 2004) y específicamente en las hojas de *E. edulis* se han descubierto alcaloides cuaternarios, esteroides y terpenos (Barrera & Mejía, 1998). A su vez, existe evidencia de que estos fitocompuestos pueden tener efectos en el sistema nervioso central actuando sobre los receptores GABA, que como indicado anteriormente, están directamente relacionados con la ansiedad y la sedación (Johnston, Hanrahan, Chebib, Duke, & Mewett, 2006; Edewor Kuponiyi, 2013)

Por estas razones la presente investigación pretende obtener y analizar el extracto metanólico de las hojas de *Erythrina edulis* con el objetivo de determinar su toxicidad en *Artemia salina* e ir en búsqueda de efectos sedantes y ansiolíticos en ratones swiss CD1 utilizando a la prueba de potenciación de sueño con pentobarbital y la prueba de tracción como medidores de sedación y al aparato de campo abierto y el laberinto elevado en cruz para medir comportamientos relacionados con la ansiedad.



## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1.1. DEFINICIONES

##### 1.1.1. Fitoterapia

Se la define como el tratamiento basado en el uso de plantas o productos extraídos de ellas con finalidad terapéutica, empleadas en la prevención, profilaxis y tratamiento de enfermedades tanto físicas como mentales (Hernandez A. , 2004).

##### 1.1.2. Planta medicinal y droga vegetal

La OMS define planta medicinal como cualquier especie vegetal en la que una o varias de sus partes, contiene sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica. A su vez define droga vegetal como la parte de la planta medicinal que es utilizada en terapéutica (OMS, 1984).

#### 1.2. Plantas como tratamiento alternativo para la ansiedad y sedación

Existen numerosas preparaciones a base de hojas, tallos, flores y raíces de plantas medicinales que son usadas en el mundo para el tratamiento de problemas en el Sistema Nervioso Central (SNC) que han demostrado eficacia por presentar efectos relajantes y ansiolíticos. La mayoría de los productos farmacéuticos actualmente en uso son derivados de plantas y alrededor del 75% de estos fueron descubiertos mediante el examen de la utilización de estas plantas en la medicina tradicional. Así mismo, las investigaciones realizadas han logrado determinar los principios activos responsables de esta actividad (Edewor Kuponyi, 2013).

Los metabolitos con efecto tipo sedante por lo general son: terpenoides como aceites esenciales y monoterpenos, flavonoides como quercetrina y la isoquercetrina, alcaloides como el ácido rosmarínico, saponinas, quinoides, lactonas entre otros (Edewor Kuponyi, 2013).

### 1.3. Descripción botánica y farmacológica de la especie vegetal estudiada

#### 1.3.1. Género *Erythrina*

El género *Erythrina* comprende una gran variedad de especies distribuidas en Sudamérica, Centroamérica, Antillas y África occidental. De este género se han aislado metabolitos con actividad biológica, pues múltiples investigaciones han encontrado efectos de tipo antimicrobiano, antiinflamatorio, analgésico, antipirético y efecto citotóxico volviendo a este género de gran interés investigativo (Pino, Prieto, Pérez, & Molina, 2004).

Las partes usadas en la medicina tradicional de las especies de *Erythrina* son las hojas y la corteza y en menor frecuencia se usa la raíz, semillas y las flores. Las principales familias químicas reportadas de este género son: alcaloides, flavonoides y proteoides (aminoácidos y lecitinas) (Pino, Prieto, Pérez, & Molina, 2004).

#### 1.3.2. *Erythrina edulis* Triana ex Micheli

**Tabla 1:** Información botánica de *Erythrina edulis*

<b>Reino:</b> Plantae	
<b>Familia:</b> Fabaceae	
<b>Género:</b> <i>Erythrina</i> L.	
<b>Especie:</b> <i>Erythrina edulis</i> Triana ex Micheli	
<b>Nombre común:</b> Cañaro, Guato	

**Fuente:** trópicos.org

#### 1.3.3. Descripción botánica

*Erythrina edulis* Triana ex Micheli planta nativa de Latinoamérica cuyo nombre proviene del griego ερυθρός (erythros) que significa rojo por el color de sus flores y *edulis* el cual es un epíteto latino que significa comestible, por su fruto rico en proteínas (Inciarte, et al., 2015). Crece entre 1500 y 2500 metros sobre el nivel del mar. Es una árbol cuya altura varía desde 8 hasta los 15 metros, presenta un tallo leñoso espinoso que alcanza un



diámetro de hasta 37cm, con copa globosa e irregular (Minga & Verdugo, 2016; Barrera & Mejía, 1998; Acero Duarte, 2002).

#### **1.3.3.1. Hojas**

De color verde claro, pubescentes, alternas, compuestas pinnadas, trifoliadas con pecíolos largos espinosos. Presentan además estípulas y glándulas (Inciarte, et al., 2015; Minga & Verdugo, 2016).

#### **1.3.3.2. Flores**

Se encuentran en forma de racimos y surgen del tronco con un promedio de 190 flores. Son bisexuales y presentan un tamaño variable entre 2 a 3,5 cm de longitud. Poseen un cáliz campanulado de color rojizo-verde y una corola papilionácea (compuesta por dos pétalos laterales o quilla y un pétalo superior) por lo general presenta un color rojo anaranjado, el pistilo está rodeado del androceo el cual está compuesto por 10 estambres fusionados en un tubo. Las inflorescencias constan de 2 o 3 racimos de un tamaño que varía entre 30-45 cm de longitud. Del 5 al 10 % de las flores fructifica en racimos de vainas, esta transformación ocurre en 65 días (Inciarte, et al., 2015; Minga & Verdugo, 2016).

#### **1.3.3.3. Fruto**

Son legumbres, cuyo tamaño de vaina es variado, con un promedio de 32 cm de longitud por 3 cm de ancho. Entre cada semilla se observa una constricción en la vaina y se pueden encontrar entre 2 a 6 semillas por vaina (Acero Duarte, 2002).

#### **1.3.3.4. Semilla**

Tienen la forma de un frijol grande de entre 4 a 5cm de largo por 2 a 3 cm de ancho. Presentan una testa lisa y según su grado de maduración el color varía entre rosado a vino tinto (Inciarte, et al., 2015).

#### **1.3.4. Fitoquímica**

La especie *Erythrina edulis* contiene en sus hojas principalmente nastoquinonas, taninos y alcaloides cuaternarios, y en menor cantidad posee esteroides y terpenos (Barrera & Mejía, 1998).



### 1.3.5. Usos tradicionales

*Erythrina edulis* es una planta multipropósito, fija el nitrógeno del suelo debido a la presencia de nódulos nitrificantes en sus raíces. Además, se le atribuyen principalmente altos valores nutricionales por su alto contenido en proteínas, por lo que puede ser usado como alimento para animales y seres humanos. En el Perú se usa el cocimiento de las semillas para tratar problemas para orinar. También se usa el agua de la cocción de las flores para aliviar irritación ocular (Acero Duarte, 2002). Según las recopilaciones descritas por Ríos y colaboradores en el libro Plantas útiles del Ecuador, comunidades ecuatorianas han usado de forma empírica una maceración de las hojas del Cañaro para el tratamiento de los nervios (Rios, Koziol, Borgtoft Pedersen, & Granda, 2007).

## 1.4. EFECTO SEDANTE

### 1.4.1. Generalidades

La sedación se define como la disminución de la capacidad de reaccionar o responder a estímulos, en donde se observa un descenso en la actividad espontánea. Mientras que la hipnosis es la situación en la que una sustancia origina somnolencia y de esta forma estimula el inicio y sostenimiento del estado de sueño similar al normal, es decir la persona despierta con facilidad (Lorenzo, et al., 2008).

En la farmacología sedación e hipnosis son estudiados a la par, pues en ambos casos se produce una depresión del SNC, diferenciándose únicamente en el grado de la misma.

El sueño es un estado fisiológico normal cíclico, de naturaleza reversible en el que se produce una disminución en el estado de conciencia y respuesta a estímulos externos, acompañado de comportamientos de inmovilidad y relajación muscular (Carrillo Mora, Ramirez Peris, & Magaña Vázquez, 2013; Urrestarazu, Escobar, & Iriarte, 2015). El acto de dormir es una actividad indispensable y vital en los seres humanos, pues a través de él se restaura la homeostasis del Sistema Nervioso Central (SNC), se reestablece la energía celular, se eliminan radicales libres, se produce una regulación térmica, hay una activación inmunológica, se permite la consolidación de información recién adquirida en la memoria, situaciones fisiológicas necesarias para mantener el equilibrio físico y mental, pues cualquier alteración del mismo se ve reflejada en el ciclo de vigilia de la persona (Carrillo Mora, Ramirez Peris, & Magaña Vázquez, 2013; Vassalli & Dijk, 2009; Diekelmann & Born, 2010). Para que el sueño sea considerado normal, no solo se toma



en cuenta la duración del sueño, sino se debe analizar también, una normalidad en el inicio, mantenimiento, sensación de sueño reparador y ausencia de molestias diurnas y nocturnas (Urrestarazu, Escobar, & Iriarte, 2015). En promedio el ser humano pasa un tercio de su vida durmiendo, sin embargo, las necesidades de sueño cambian en el transcurso de la vida, principalmente esto se debe a la edad, aunque también intervienen por factores sociales, emocionales y de salud (Carrillo Mora, Ramirez Peris, & Magaña Vázquez, 2013; Martínez Martínez, 2016).

#### 1.4.2. Fases del sueño

El sueño comprende dos etapas que se alternan y son: la fase No-REM y la fase REM. Este ciclo se repite entre 4 a 6 veces en el transcurso de la noche.

**El sueño No-REM** es el período de ondas lentas, dura entre 70 a 100 minutos, en él se identifican 4 etapas; las etapas 1 y 2 son las de sueño superficial, la primera se caracteriza por somnolencia y dura de 1 a 7 minutos, en la segunda hay una disminución del ritmo cerebral, se produce disminución de frecuencia respiratoria y cardíaca acompañado de relajación muscular. Las fases 3 y 4 constituyen ya el sueño profundo y se caracterizan por el aumento de ondas delta (Gonçalves, 2011).

**El sueño REM** es el periodo de movimientos oculares rápidos, aparece a continuación de la fase 4 del sueño No-REM y dura entre 5 a 30 minutos, se observa una gran actividad cerebral y en él se produce la actividad onírica (Gonçalves, 2011).

#### 1.4.3. Fisiología del sueño

En la regulación del sueño participan diferentes áreas del cerebro que cumplen funciones específicas que son:

1. Área preóptica del hipotálamo, principal responsable de mantener homeostasis en el sueño, controla la duración, la profundidad y la cantidad del mismo.
2. Tallo cerebral rostral, responsable del cambio cíclico entre sueño REM y No-REM
3. Hipotálamo anterior, regula el sistema circadiano, permite mantener el estado de vigilia y de sueño (Carrillo Mora, Ramirez Peris, & Magaña Vázquez, 2013).

Junto con las distintas estructuras que intervienen en el sueño, también juegan un papel importante distintos neurotransmisores en la regulación del sistema sueño-vigilia, expuestos en la **Tabla 2**.

**Tabla 2:** Neurotransmisores en el ciclo sueño-vigilia

NEUROTRANSMISOR	FUNCIÓN
<b>Dopamina</b>	Neurotransmisor excitador, ayuda a mantener el estado de vigilia, pues cuando sus niveles se ven aumentados producen un efecto de alerta
<b>Noradrenalina</b>	Al ser las neuronas del <i>locus coeruleus</i> estructuras noradrenérgicas, estas se encuentran activas en la vigilia y silentes en fases REM del sueño.
<b>Histamina</b>	Cumple funciones de reducción del sueño y mantenimiento de estado de alerta, así como también permite la liberación de otras hormonas.
<b>Glutamato</b>	Neurotransmisor excitador por excelencia, se ve implicado en la vigilia al activar el sistema reticular ascendente.
<b>Orexinas</b>	Al estar presentes en distintos núcleos cerebrales relacionados con la vigilia, se requiere un adecuado funcionamiento de estas sustancias para un mantenimiento de la vigilia
<b>Ácido gamaaminobutírico (GABA)</b>	Las neuronas GABAérgicas producen una inhibición del sistema reticular ascendente lo que da lugar a la aparición de sueño lento.
<b>Adenosina</b>	Neurotransmisor inhibitorio, participa en procesos que facilitan el sueño, pues se acumula a lo largo del día y luego se libera para dar lugar al periodo de sueño.
<b>Acetilcolina</b>	Neurotransmisor que mantiene activadas las neuronas corticales lo que permite el funcionamiento de la corteza cerebral en la vigilia, en el sueño su liberación se ve disminuida.
<b>Serotonina</b>	Su administración funciona como hipnótico natural, reduce la latencia del sueño y los múltiples despertares.
<b>Melatonina</b>	Se libera únicamente en la noche y se ve relacionada con procesos de producción de sueño y sincronización del ritmo circadiano.

**Fuente:** (Díaz, 2013)

#### 1.4.4. Trastornos del sueño

Los marcados cambios de estilos de vida que existen en la actualidad han dado paso a alteraciones en los patrones de sueño, problema de alto interés en salud pública pues lleva consigo más que simples molestias como cansancio, somnolencia, o disminución en la productividad al trabajar, pues traen consigo un riesgo mayor de sufrir enfermedades graves a largo plazo como son: diabetes, enfermedades cardíacas, neurológicas, obesidad, e incluso tiene efectos perjudiciales en la cognición y la memoria (Palma, Urrestarazu, & Iriarte, 2013; Palma, 2015).

Los trastornos del sueño se definen como cualquier problema que ocurre al momento de dormir, es decir incluye modificaciones en el patrón del sueño o cualquier conducta anormal en el mismo, son enfermedades que afectan al 35-40% de la población adulta,



estadística que puede ir en aumento en el futuro, por lo que su detección y diagnóstico adecuados e inmediatos, son indispensables para mantener íntegra la calidad de vida del paciente y evitar graves consecuencias (Palma, 2015).

#### 1.4.5. Clasificación de los trastornos del sueño

La última clasificación de los trastornos del sueño fue propuesta en el 2014 por la American Academy of Sleep Medicine (AASM) quienes publicaron la tercera clasificación de los trastornos del sueño conocida como ICSD-3 (International Classification of Sleep Disorders), la misma que se presenta en la **Tabla 3**.

**Tabla 3:** Clasificación de los trastornos del sueño ICSD-3

<b>INSOMNIOS</b>	<b>TRASTORNOS RESPIRATORIOS</b>	<b>HIPERSOMNIAS CENTRALES</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Insomnio crónico</li> <li>- Insomnio de corta evolución</li> <li>- Otros insomnios</li> <li>- Variantes</li> <li>- Excesivo tiempo en cama               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dormidor corto</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Apneas obstructivas del sueño               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Del Adulto</li> <li>- Del niño</li> </ul> </li> <li>- Apneas centrales del sueño</li> <li>- Trastornos de hipoventilación</li> <li>- Hipoxemia del sueño</li> <li>- Síntomas aislados o variantes               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ronquido</li> <li>- Catatrenia</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Narcolepsia tipo 1</li> <li>- Narcolepsia tipo 2</li> <li>- Hipersomnia idiopática</li> <li>- Síndrome de Kleine-Levin</li> <li>- Síndrome de sueño insuficiente.</li> <li>- Hipersomnias secundarias</li> <li>- Variantes               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dormidor largo</li> </ul> </li> </ul>
<b>TRASTORNOS DEL RITMO SUEÑO-VIGILIA</b>	<b>PARASOMNIAS</b>	<b>MOVIMIENTOS ANORMALES</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fase de sueño retrasada</li> <li>- Fase de sueño avanzada</li> <li>- Fase de sueño irregular</li> <li>- Ritmo no de 24 horas</li> <li>- Trabajo en turnos</li> <li>- Jet-lag</li> <li>- Otros trastornos del ritmo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No relacionadas con REM</li> <li>- Relacionadas con REM</li> <li>- Otras parasomnias</li> <li>- Síntomas aislados o variantes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Piernas inquietas</li> <li>- Movimientos periódicos de los miembros.</li> <li>- Calambres del sueño</li> <li>- Bruxismo</li> <li>- Movimientos rítmicos relacionados con el sueño</li> <li>- Mioclonías benignas del lactante</li> <li>- Mioclonías propioespinales</li> <li>- Otros, secundarios y no especificados</li> </ul>

**Fuente:** (Urrestarazu, Escobar, & Iriarte, 2015)



De los trastornos indicados el más común y de mayor prevalencia en la población es el insomnio, se estima que alrededor del 30% de la población la presenta, sin embargo solo el 6% tiene un diagnóstico clínico (Viniegra, et al., 2014). La apnea obstructiva del sueño es otro de los trastornos que se presenta con mayor frecuencia, se estima que del 1-3% de la población lo sufre (Santiago, et al., 2014).

#### 1.4.6. Insomnio

El insomnio es un trastorno de sueño caracterizado por la incapacidad persistente de iniciar o mantener el sueño, así como la dificultad de tener un sueño de calidad o reparador, síntomas que impiden tener un estado de vigilia normal. Para tener un diagnóstico clínico de insomnio es necesario que dichos problemas se presenten por más de tres semanas y que estén acompañados de síntomas diurnos como somnolencia, cansancio, dificultad en la atención, falta de energía, cambios de humor entre otros síntomas que afectan las funciones del día al día de la persona (Basta, Chrousos, Vela-Bueno, & Vgontzas, 2007; López de Castro, Fernández, Mareque, & Fernández, 2012). El insomnio es más frecuente en mujeres que en hombres, y en personas con enfermedades neurológicas, psiquiátricas y crónicas. Su frecuencia es mayor en la tercera edad, sin embargo es necesario tomar en cuenta que en esta población es normal en algunos casos las modificaciones en el patrón del sueño (López de Castro, Fernández, Mareque, & Fernández, 2012).

##### 1.4.6.1. Tipos de insomnio

#### Insomnio crónico

Se considera crónico cuando la duración de los síntomas tanto nocturnos como diurnos es de tres semanas al mes y por tres meses consecutivos (Urrestarazu, Escobar, & Iriarte, 2015).

Incluye los siguientes subtipos:

- a. **Insomnio psicofisiológico:** Se caracteriza por presentar una conducta condicionada que impide iniciar el sueño, y está acompañado de múltiples despertares. Este insomnio mejora al cambiar las condiciones habituales al dormir (Gállego Pérez-Larraya, Toledo, Urrestarazu, & Iriarte, 2007; Urrestarazu, Escobar, & Iriarte, 2015).



- b. **Insomnio Idiopático:** De inicio en la infancia, se produce sin un mecanismo que lo desencadena, la dificultad para dormir persiste a lo largo de la vida del paciente (Anzures, Kassab, & Alvarado, 2010).
- c. **Insomnio paradójico o pseudoinsomnio:** caracterizado por la sensación de padecer insomnio severo, el paciente refiere problemas al conciliar el sueño y tiempo corto de sueño, sin que este sea demostrable, pues incluso por técnicas de encefalograma se observa una duración de sueño normal (Urrestarazu, Escobar, & Iriarte, 2015).
- d. **Insomnios crónicos debidos a causas específicas:** entre estos se encuentran, insomnio por inadecuada higiene del sueño, insomnio debido a alteraciones mentales, insomnio por problemas médicos, insomnio por fármacos o drogas e insomnio conductual de la infancia (Urrestarazu, Escobar, & Iriarte, 2015).

### **Insomnio de corta evolución o agudo o de ajuste**

Se considera agudo cuando los síntomas del insomnio tienen menos de tres meses de duración, además de que se conoce cuál es el factor desencadenante del problema. Por lo general es transitorio y desaparece cuando la persona se ajusta al evento estresante. Puede deberse a factores psicológicos, interpersonales, psicosociales, cambios de ambiente, entre otros (Urrestarazu, Escobar, & Iriarte, 2015; Anzures, Kassab, & Alvarado, 2010).

### **Otros tipos de insomnio**

Este diagnóstico se da cuando se presentan síntomas de insomnio, pero ninguno de los tipos anteriores lo incluye (Urrestarazu, Escobar, & Iriarte, 2015).

### **Variantes**

- **Tiempo excesivo en cama:** Ocurre cuando la persona duerme más tiempo del habitual o se queda en cama en la mañana demasiado tiempo, lo que provoca que en las noches presente un periodo de vigilia y no pueda conciliar el sueño pronto (Urrestarazu, Escobar, & Iriarte, 2015).
- **Dormidor corto:** es una tendencia personal en la cual la persona duerme menos de 6 horas diarias, pero no presenta ninguna molestia nocturna o diurna que le impida desarrollar sus actividades (Urrestarazu, Escobar, & Iriarte, 2015).



#### 1.4.6.2. Diagnóstico

El diagnóstico del insomnio se lo realiza fundamentalmente en base a lo que el paciente indica verbalmente. De tal forma que se deben evaluar y seguir los siguientes parámetros para dar un diagnóstico correcto:

1. **Historia Clínica:** se debe incluir los detalles completos de los hábitos de sueño del paciente, sus antecedentes familiares y personales, en donde se incluya hábitos, enfermedades médicas y psiquiátricas, tratamientos farmacológicos y uso o no de sustancias como alcohol y drogas.
2. **Historia del sueño:** se recopilará información acerca de todo problema que se presenta al dormir, así como las consecuencias diurnas que se presentan por las quejas en el sueño.
3. **Exploración física y analítica:** con el fin de detectar posibles enfermedades o descartarlas.
4. **Diario del sueño:** lo realiza el paciente, en él registra hora en la que se acuesta, tiempo que tarda en dormir, despertares nocturnos, siestas y periodos de somnolencia en el día. Permite detectar posibles factores que desencadenan el problema de sueño.
5. **Exploraciones complementarias:** Son de gran utilidad pues son una medida objetiva, son la polisomnografía y actigrafía (Martín Águeda, 2016).

#### 1.4.6.3. Tratamiento

##### Tratamiento no farmacológico

El punto clave de este tratamiento es empezar a instaurar hábitos en el paciente que permitan tener una buena higiene del sueño (**Tabla 4**), para evitar la aparición de alteraciones en su patrón.

**Tabla 4:** Recomendaciones para una buena higiene de sueño.

Medidas de higiene del sueño	
-	Conservar un horario definido para ir a dormir y levantarse
-	Permanecer en la cama únicamente 8 horas
-	Mantener una dieta adecuada y a horas regulares, evitar comer en forma abundante y tampoco ir a dormir con hambre.
-	Evitar consumir sustancias estimulantes como cafeína, alcohol o nicotina por lo menos 4 horas antes de acostarse.
-	No tomar siestas prolongadas de más de 1 hora en el día
-	Realizar ejercicio físico suave
-	Evitar realizar antes de dormir actividades estimulantes con luz brillante como ver televisión, internet, o videojuegos.
-	Utilizar la cama únicamente para dormir
-	Crear un ambiente adecuado para dormir, como es un cuarto tranquilo, con temperatura templada, oscuro, con una cama y almohada confortable.
-	Tener un espacio de relajación de por lo menos 30 minutos antes de dormir
-	No acostarse si se encuentra preocupado, ansioso o con pensamientos estresantes

**Fuente:** (Carrillo Mora, Ramirez Peris, & Magaña Vázquez, 2013; Sánchez, Navarro, Nellen, & Halabe, 2016)

Otras técnicas que son de utilidad en el tratamiento del insomnio son las terapias conductuales y psicológicas en las que se encuentran las especificadas en la tabla 5.

**Tabla 5:** Terapias psicológicas y conductuales para el insomnio en orden de evidencia científica.

Terapias psicológicas y conductuales para el insomnio		
<b>Control estímulos</b>	<b>de</b>	Su objetivo es fortalecer la relación cama/dormitorio con la acción única de dormir.
<b>Restricción sueño</b>	<b>del</b>	Con esta técnica se limita el tiempo que la persona puede permanecer en la cama, con el objetivo de presionar el sueño.
<b>Ejercicios Relajación</b>	<b>de</b>	Encaminados a la reducción del hiperarousal fisiológico que tienen los pacientes con insomnio.
<b>Terapia Cognitiva</b>		Se basa en una reestructuración cognitiva de los pensamientos y percepciones equívocas que tienen los pacientes sobre el sueño con el fin de reducir la ansiedad y mejorar el sueño y el funcionamiento diurno del individuo.

**Fuente:** (Cañellas Dols, 2016)



## Tratamiento Farmacológico

Se inicia cuando las terapias no farmacológicas no logran eliminar el insomnio en el paciente o cuando el insomnio es grave y trae consigo alteraciones importantes para la salud del paciente. Es importante tomar en cuenta que para un tratamiento ideal para el insomnio se debe, usar la dosis menor efectiva, usar los fármacos en tiempos cortos (menos de 4 semanas), en dosis intermitentes y su discontinuación debe ser en forma gradual, todo esto para evitar la dependencia a los mismos (Sánchez, Navarro, Nellen, & Halabe, 2016)

En la actualidad existen diferentes medicamentos para tratar el insomnio, entre los disponibles, en orden de los más usados están:

- **Hipnóticos benzodiazepínicos:** son agonistas no selectivos del receptor del ácido gamaaminobutírico A (GABA-A), al ejercer su acción ayudan a disminuir el tiempo en conciliar el sueño y prolongan su duración, pero afectan en la arquitectura del mismo, al alterar la duración de las etapas de sueño.
- **Hipnóticos no benzodiazepínicos:** También conocidos como “Fármacos Z” son el Zolpidem, Zoplicona, Zaleplon, tienen una acción similar a las benzodiazepinas, pero con la diferencia de que estos son agonistas selectivos del GABA-A, además de que interfieren en forma mínima en las fases del sueño. Son los únicos medicamentos para el insomnio en los que se ha determinado su eficacia y seguridad a largo plazo, en ensayos controlados de 6 y hasta 12 meses (Minkel & Krystal, 2013)
- **Agonistas del receptor de Melatonina:** la melatonina es una hormona que juega un papel importante en el control del sistema circadiano, los fármacos disponibles son el Ramelteon y Agomelatina. Debido a su seguridad se las puede usar hasta por un periodo de 13 semanas, sin riesgo de dependencia, sin embargo solo son útiles para tratar el insomnio al disminuir el tiempo de latencia del sueño (Álamo González, 2016).
- **Otros fármacos:**
  - o **Antidepresivos:** se usan en dosis menores a las habituales, sin embargo, su uso no cuenta con la suficiente evidencia de eficacia y seguridad, algunos de ellos son amitriptilina, doxepin y mirtazapina, entre otros (Minkel & Krystal, 2013).



- **Antihistamínicos:** al presentar como efecto adverso la sedación, se han utilizado para tratar el problema de insomnio, sin embargo, al tener acciones anticolinérgicas y desarrollar tolerancia rápida solo son usados en insomnios leves (López de Castro, Fernández Rodríguez, Mareque Ortega, & Fernández Agüero, 2012).
- **Antipsicóticos:** al usarse en dosis bajas promueven el sueño por ser antagonistas de dopamina, histamina, serotonina, acetilcolina y norepinefrina (Minkel & Krystal, 2013).
- **Barbitúricos:** Eran el tratamiento de elección, pero su estrecho rango terapéutico, sus múltiples efectos adversos y la dependencia que provocan los llevo al desuso para este tipo de problemas (Lorenzo, et al., 2008).
- **Fitoterapia:** es muy usada en las poblaciones, principalmente usan plantas como *Valeriana officinalis*, *Melissa officinalis*, *Passiflora incarnata*, entre otros.

## 1.5. Ansiedad

La ansiedad es una respuesta normal del ser humano ante un estímulo nuevo, negativo o de incertidumbre, que permite a la persona ajustarse frente a las nuevas situaciones, que tiene como resultado respuestas a tres niveles: fisiológico, afectivo y cognitivo además de una respuesta motor-conductual (Navas, W. & Vargas, M., 2012; Arenas, C. & Puigcerver, A., 2009). Cuando la respuesta se encuentra en niveles elevados, surge sin un estímulo desencadenante o es de tipo inadecuada resulta en un proceso patológico traduciéndose en un estado de hipervigilancia, miedo y sentimientos de indefensión dando paso a un trastorno de ansiedad (TA) (Lorenzo, et al., 2008; Fernandez Teruel, 2008; Vindel, 2011; Arenas & Puigcerver, 2009).

### 1.5.1. Síntomas

Las respuestas producidas por los TA son muy variados y dependen del trastorno que padezca el paciente, sin embargo, los más comunes suelen ser síntomas gastrointestinales, sudoración excesiva, hiperventilación, tensión muscular, fatiga, insomnio y sensación de miedo (Navas & Vargas, 2012; Arenas & Puigcerver, 2009).



### 1.5.2. Clasificación

Según la cuarta edición del Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Navas & Vargas, 2012), estos trastornos se incluyen:

- 1) **Ansiedad Generalizada:** Incluye ansiedad crónica, así como preocupaciones excesivas. El tiempo mínimo para realizarse un diagnóstico es de 6 meses de observación al paciente.
- 2) **Ansiedad Social:** respuesta de ansiedad exagerada a situaciones sociales donde el individuo se siente vulnerable a ser juzgado o criticado.
- 3) **Fobias:** es un temor o miedo marcado que se expresa de forma excesiva, prolongada y sin razón aparente hacia un objeto o situación donde se presenta una ansiedad anticipatoria.
- 4) **Trastorno de pánico con o sin agorafobia:** son crisis de angustia recidivantes e inesperadas que producen un estado constante de preocupación, en caso de ser acompañados con agorafobia el paciente experimenta una ansiedad extrema acompañada de miedo hacia un resultado catastrófico desconocido.
- 5) **Trastorno obsesivo compulsivo:** las obsesiones son caracterizadas por provocar ansiedad significativa, se definen como intrusas, inapropiadas y persistentes. Las compulsiones por otro lado definen a las acciones que el paciente realiza para aliviar la ansiedad, sin embargo, no presenta un estímulo de satisfacción al realizarlas.
- 6) **Trastorno de estrés post traumático:** ocurre cuando el paciente re experimenta una situación traumática por la activación de una ansiedad exagerada junto con el alto comportamiento de huida del individuo, puede suceder hasta los seis meses después de haber sucedido el evento.
- 7) **Trastorno de estrés agudo:** similar al citado anteriormente pero en periodos comprendidos entre los 2 y 30 días.
- 8) **Trastorno de ansiedad inducido por sustancias:** resultan como efectos secundarios de ciertas drogas, fármacos o agentes tóxicos.
- 9) **Ansiedad secundaria a condiciones médicas:** provocados por los efectos fisiológicos de una enfermedad previa.



### 1.5.3. Neuroanatomía y la ansiedad

Los trastornos de ansiedad responden a las acciones de ciertas estructuras anatómicas del SNC, estas comprenden:

- **Locus Coeruleus (LC):** responde a estímulos en receptores GABA-benzodiazepínicos y serotoninérgicos así como del péptido intestinal vasoactivo, factor liberador de corticotropina, la sustancia P y la acetilcolina. Esta estructura estimula a su vez a otras partes anatómicas relacionadas con la ansiedad como lo son el hipocampo, el hipotálamo y la amígdala (Goddard, A. & Charney, D., 1997). El aumento del sistema noradrenérgico originado en el LC resulta la piedra angular para que las emociones y la ansiedad se desarrollen (Reyes, 2010; Steimer, 2002).
- **Amígdala:** regulada por receptores como los benzodiazepínicos, noradrenérgicos y serotoninérgicos; su función está relacionada con las respuestas de ansiedad y sentimientos de miedo debido a su acción sobre el sistema autonómico, neurohumoral y musculoesquelético (Reyes, 2010).
- **Tálamo:** a él llegan los estímulos ambientales de peligro y se encarga de transmitir señales hacia la amígdala para producir respuestas ante potenciales amenazas (Reyes, 2010; Steimer, 2002).
- **Hipotálamo:** al momento en que se presencia una amenaza el hipotálamo lateral se encarga de la activación simpática que además de producir cambios fisiológicos se relaciona con la psicopercepción de estímulos emocionales (Reyes, 2010; Steimer, 2002).
- **Substancia gris periacueductal:** recibe señales de la amígdala y da paso a una acción inmediata frente a amenazas inminentes, genera una respuesta de lucha o huida (Reyes, 2010).
- **Hipocampo:** debido a que contiene una gran cantidad de receptores de 5HT1A se considera un centro importante para la generación de la ansiedad, debido a la eficacia que tienen los fármacos antidepresivos frente a esta (Reyes, 2010).
- **Corteza orbito-frontal:** se relaciona íntimamente con el procesamiento de situaciones de carácter emocionalmente relevantes para dar una respuesta ante peligros almacenando información sobre las acciones más eficaces (Reyes, 2010).



#### **1.5.4. Neuroquímica del miedo y la ansiedad**

##### **1.5.4.1. Sistema Noradrenérgico (NA)**

En situaciones de ansiedad y estrés, hay un elevado incremento en la actividad del sistema NA, especialmente regiones como el hipotálamo, la amígdala y el LC, sin embargo, la localización precisa de los receptores estimulados es de gran importancia para producir respuestas de tipo ansiogénicas.

La noradrenalina está muy vinculada con la etiología y los síntomas de un ataque de pánico, los pacientes que tienen respuestas alteradas frente a la estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos tienden a presentar estos síntomas (Arenas & Puigcerver, 2009).

Para estudiar las alteraciones de los adrenoreceptores  $\alpha_2$  se ha utilizado antagonistas como la yohimbina demostrando que los individuos con una sensibilidad alterada frente a esta sufren más ataques de pánico y presentan un nivel plasmático elevado de metabolitos de noradrenalina como el 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) (Reyes, 2010; Steimer, 2002).

##### **1.5.4.2. Sistema Serotoninérgico**

El sistema serotoninérgico está muy relacionado con los síntomas de la ansiedad, se ha visto que el receptor 1A serotoninérgico está muy implicado en los ataques de pánico (Navas & Vargas, 2012; Reyes, 2010). En estos pacientes, la presencia de agentes secretores y agonistas de 5-HT como la m-clorophenilpiperazina y la fluramina tienen un efecto ansiogénico.

Si se tiene presente el hecho de que la serotonina inhibe la actividad del locus ceruleus, niveles bajos de serotonina en líquido cefalorraquídeo y en plasma darían paso a la aparición de síntomas de ansiedad, es por esto que un desbalance con la serotonina podría dar paso a una ansiogénesis patológica, razón por la cual el uso de inhibidores selectivos de recaptación de serotonina (ISRS) resulta muy efectivo en el tratamiento de TA, sumado a la interacción fisiológica que tiene este neurotransmisor con la noradrenalina (Reyes, 2010).



#### 1.5.4.3. Receptores benzodiazepínicos y el ácido Gamma-Aminobutírico (GABA)

Los receptores GABA<sub>A</sub> dan paso a los efectos farmacológicos conocidos de las BZD como lo son la ansiólisis, hipnosis, sedación y relajación muscular, esto es especialmente cierto en el subtipo  $\alpha_2$ -GABA<sub>A</sub>, receptor responsable de la acción del Diazepam (DZ). Estructuras neuroanatómicas importantes para la ansiogénesis como el hipocampo y la amígdala tienen gran cantidad de este subtipo de receptor (Reyes, 2010; Steimer, 2002).

Es conocido también que agonistas inversos de los receptores GABA/benzodiazepínicos como la  $\beta$ -carbolinas tienen un efecto ansiogénico y proconvulsivantes (Reyes, 2010; Steimer, 2002).

#### 1.5.5. Tratamiento

El tratamiento puede constar de psicoterapia, de medicación o de ambas; si la condición es detectada tempranamente es más probable un tratamiento no farmacológico. Como describen Navas & Vargas en su revisión sobre la ansiedad dirigida hacia la atención primaria, se puede brindar un tratamiento tanto a corto plazo como a largo plazo.

El tratamiento a corto plazo ha demostrado ser más efectivo al combinar la terapia farmacológica y la intervención psicológica. El paciente debe ser observado durante 12 semanas para evaluar su estado (Navas & Vargas, 2012). En cuanto al tratamiento a largo plazo refiere, comprende un periodo de 3 a 4 meses. En este punto se utilizan fármacos benzodiazepínicos o antidepresivos acompañados de la terapia psicológica, pudiendo ser la psicoterapia el único tratamiento (Navas & Vargas, 2012).

##### 1.5.5.1. Tratamiento farmacológico

Debido a que en muchos casos es necesario administrar fármacos de forma crónica (periodo mayor a 6 meses) se deben utilizar fármacos eficaces, seguros y de acción inmediata. Pueden ser administrados para este fin benzodiazepinas (BZD), antidepresivos y otros fármacos de segunda elección como la buspirona (Navas & Vargas, 2012).

- **Benzodiazepinas:** fármacos de primera elección, efectivos para el tratamiento de corto plazo, su uso para tratamientos prolongados es cuestionable debido principalmente a su potencial adictivo.



- **Antidepresivos:** son de más utilidad para tratamientos de largo plazo, pero tienen un alto riesgo de producir síntomas de retirada y ansiedad transitoria. Se utilizan antidepresivos tricíclicos (ATC), ISRS e inhibidores no selectivos de serotonina y noradrenalina (IRSN) (Navas & Vargas, 2012).

### 1.6. Benzodiacepinas (BZD)

Descubiertas en 1930 por Stenback, sin embargo, fue en el año 1957 cuando se les empezó a utilizar con la introducción del clordiacepóxido como agente ansiolítico. Pero no fue hasta la introducción del DZ, cuando se empezaron a usar exitosamente debido a que con él se incrementó el margen de seguridad y eficacia terapéutica por su alta especificidad en la ansiedad en comparación con los demás fármacos. Actualmente constituyen un grupo farmacológico muy usado para tratar ansiedad, aunque también son utilizados en la práctica clínica con otros fines como son: anticonvulsivos, relajantes musculares e hipnóticos, siendo el ultimo uno de los usos más comunes en la actualidad (Rosas Gutiérrez, Simón Arceo, & Mercado, 2013; Lorenzo, y otros, 2008).

#### 1.6.1. Mecanismo de acción:

Las BZD imitan la acción del ácido gamma-aminobutírico (GABA), el cual es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC. Existen tres tipos de receptores GABA; GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub>, GABA<sub>C</sub>, de los cuales el receptor GABA<sub>A</sub> es el que se relaciona con los receptores de las BZD. Este receptor es un complejo glicoproteico heteropentamérico (por lo general está formado por dos subunidades  $\alpha$ , dos unidades  $\beta$  y una unidad  $\gamma$ ) que posee sitios de unión específicos para varios ligandos: su agonista GABA, y moduladores alostéricos tales como benzodiazepinas, barbitúricos y esteroides. El sitio específico de unión de las BZD en este receptor está formado en la posición 101 de la unidad  $\alpha$ 1 por el aminoácido Histidina (Lorenzo, y otros, 2008; Rosas Gutiérrez, Simón Arceo, & Mercado, 2013).

Cuando las benzodiazepinas se unen a la interfase de las unidades alfa y gamma del receptor incitan a un cambio estructural volviéndolo más afín para el neurotransmisor GABA, produciendo un aumento de la frecuencia de apertura del canal iónico de cloro sin modificar la conductancia del mismo ni el tiempo de apertura del canal, lo que produce una hiperpolarización neuronal, y por tanto la neurona se hace menos susceptible a estímulos activadores, dando como resultado un estado de inhibición neuronal con lo que



se tienen como consecuencia un efecto ansiolítico y sedante (Rosas Gutiérrez, Simón Arceo, & Mercado, 2013).

La acción que cumplan las BZD va a depender del tipo de unidad  $\alpha$  que contenga el recepto  $GABA_A$  al que se unan, en la actualidad se conoce que existen 5 tipos de receptores benzodiazepínicos, de los cuales solo se conoce la función de 3:

- Receptor BZD1 o  $\omega_1$  se encuentra en el cerebro y cerebelo principalmente y media las acciones anticonvulsivas, ansiolíticas y sedantes.
- Receptor BZD2 o  $\omega_2$  encontrado en el núcleo central del lóbulo temporal, hipocampo y en el cuerpo estriado, esta media las acciones ansiolíticas.
- Receptor BZD3 o receptor periférico, este se encuentra en el riñón y media las acciones de relajación muscular (Rosas Gutiérrez, Simón Arceo, & Mercado, 2013).

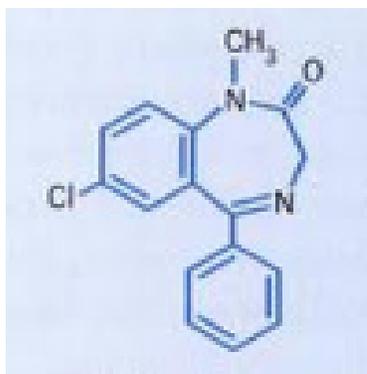
### 1.6.2. Reacciones adversas y seguridad de las Benzodiazepinas

Las BZD presentan riesgos, dependientes de sus efectos farmacológicos, de las características del paciente y de la prescripción irracional a dosis no adecuadas y por periodos extensos (Dominguez, Collares, Ormaechea, & Tamosiunas, 2016). La duración del tratamiento indicada es de 2 a 4 semanas en el insomnio y de 8 a 12 semanas en la ansiedad.

Entre los efectos adversos que más se les atribuyen a las BZD están: sedación, deterioro psicomotor, accidentes y caídas, deterioro en las habilidades complejas y de la conducción, riesgo de deterioro cognitivo (atención y memoria) especialmente en ancianos por lo que es recomendable no usarlos en esta población (Azparren & Garcia, 2014). Además de que pueden causar dependencia cuando su uso es a largo plazo, por lo que siempre es recomendable que se las indique por tiempos cortos.

### 1.6.3. Diazepam

BZD de semivida plasmática larga, fue aprobada por la FDA en 1963, es una de las drogas más conocidas en el mundo. Su nombre químico es 7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona (**Fig.1**). Es una droga que se usa como ansiolítico, sedante, anticonvulsivo (estatus epiléptico), para la enfermedad por abstinencia con el alcohol, y como relajante muscular (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, CONASA, 2014)



**Fig. 1:** Estructura química del diazepam.

**Fuente:** (Lorenzo, y otros, 2008)

### 1.6.3.1. Farmacocinética

Dependiendo de su presentación puede ser administrado por vía oral (VO), intravenosa (IV) e intramuscular (IM). Su biodisponibilidad resulta de aproximadamente 80% cuando se administra por vía oral e intramuscular y tiene un porcentaje de unión a proteínas de 98%. Su absorción es rápida. Tiene un volumen de distribución de 0.8-1.0 L/Kg (Martino & Martino, 2007).

### 1.6.3.2. Metabolismo y excreción

Es metabolizado en el hígado transformándose en tres metabolitos activos diferentes; N-desmetil-diazepam, temazepam y oxazepam. Su eliminación es representada en un modelo de curva bifásica, la primera comprende la fase de distribución rápida y prolongada, la segunda refiere a la eliminación igualmente prolongada; su vida media es de hasta 48 horas y el metabolito N-desmetil-diazepam permanece en el organismo hasta 100 horas. Los metabolitos del DZ son eliminados por la orina, siendo su aclaramiento de 20-30 mL/minuto (Martino & Martino, 2007).

## 1.7. Animales de experimentación

### 1.7.1. Modelos biológicos para la evaluación del efecto farmacológico

Los animales de laboratorio son piezas claves dentro de la investigación biomédica, como es en el desarrollo de nuevas drogas, pues ayudan a tener un acercamiento en cómo sería su comportamiento en el ser humano. Al ser estos animales un referente de la investigación, su crianza debe estar vigilada y estandarizada, es decir deben ser criados



en ambientes controlados que cumplan todos y cada uno de los requerimientos de la especie en cuestión, a la vez que incluyan un trato digno y ético que asegure su bienestar (Hernandez S. , 2006). El modelo animal más usado es el de los roedores en especial los ratones pues el 99% de sus genes tienen contraparte humana, además de que poseen la ventaja de ser económicos en su crianza y mantenimiento, su fisiología y genética han sido estudiadas ampliamente. También se han desarrollado varios modelos en ratón de enfermedades humanas que permiten evaluar efectividad y toxicidad de drogas en desarrollo (Jhonson, 2016).

#### 1.7.1.1. Raton CD1 (Caesaream Derived 1)

El ratón CD-1 es un ratón suizo que se utiliza como modelo general de uso en investigación, tanto oncológica como farmacéutica, además en pruebas de seguridad y eficacia. Al igual que muchas cepas de ratones los ratones CD-1 son albinos, lo que se debe a una mutación en el gen de la tirosinasa (enzima limitante en la producción de melanina). Los ratones CD-1 son un stock exogámico (en ratones endogámicos se conocen como cepas, mientras que en exogámicos son stock) por lo que representan más parecidamente la variabilidad genética de los seres humanos, lo cual les hace óptimos para ser usados en farmacología (Jhonson, 2016; University of Jerusalem, 2002)

#### 1.7.1.2. Artemia Salina

- **Phylum:** *Arthropoda*
- **Clase:** *Crustaceae*
- **Subclase:** *Branchiopoda*

Conocidos también como “Brine shimp” son camarones diminutos, transparentes y de cuerpo blando, habitan aguas altamente salinas pudiendo desarrollarse entre 6 y 35°C. Los huevos de Artemia salina pueden seguir dos caminos, eclosionar en forma de larvas de 1mm o permanecer como quistes durante periodos de tiempo prolongados, esta característica hace de la especie un modelo ideal para bioensayos, pues posee la ventaja de tener un bajo costo, las colonias obtenidas son siempre suficientes y carecen de variación en cuanto a edad y características fisiológicas (Pino Pérez & Jorge Lazo, 2010).



## **1.8. PRUEBAS PARA LA EVALUACION DEL EFECTO SEDANTE**

### **1.8.1. Potenciación del sueño con Pentobarbital sódico**

Este método se basa en la evaluación de la prolongación del sueño inducido por Pentobarbital, método utilizado para la detección de agentes sedantes e hipnóticos. El ensayo se utiliza para revelar las propiedades activas del SNC de los extractos. La prolongación del sueño inducido por los barbitúricos no solo se produce por hipnóticos, sedantes y tranquilizantes, sino también por antidepresivos en altas dosis (Sheik, Vedhaiyan, & Singaravel, 2014).

### **1.8.2. Prueba de Tracción**

Fue planteado por Courvoisier en 1956, y es utilizado para valorar la fuerza muscular o la función neuromuscular en los roedores, que puede estar influenciado no solamente por los fármacos sedantes y los compuestos relajantes musculares sino también por agentes tóxicos (Vogel & Vogel, 2013). El fármaco tiene acción sedativa cuando el animal no efectúa un restablecimiento en menos de 5 segundos, el método tiene la ventaja de no estar influenciado por la acción catatónica eventual (Sanchez, 1962).

## **1.9. PRUEBAS PARA LA EVALUACION DEL EFECTO ANSIOLÍTICO**

### **1.9.1. Campo Abierto**

El test desarrollado por Calvin S. Hall en 1934, es útil para evaluar parámetros de conducta y emocionalidad mediante la actividad locomotora y exploratoria. En esta prueba se aprovecha la aberración natural de los roedores a los espacios abiertos e iluminados para evaluar las respuestas de los mismos frente a situaciones de estrés (Bailey & Crawley, 2009).

### **1.9.2. Laberinto elevado en cruz**

Método muy utilizado para medir respuestas de estrés y ansiedad, aprovecha el comportamiento exploratorio natural de los roedores, así como la aberración a lugares expuestos y elevados. Los animales recorren libremente los brazos del laberinto pudiendo escoger entre los abiertos y cerrados lo que determinará el nivel de ansiedad en el que se encuentran; los ratones expuestos a una droga ansiolítica producen un mayor número de ingresos en los brazos abiertos, permaneciendo más tiempo en los mismos (Bailey & Crawley, 2009).



## CAPITULO 2

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. Tipo de investigación

Estudio de tipo experimental puro en el área de Farmacología.

#### 2.2. Localización

Las actividades prácticas del presente estudio se efectuaron en los laboratorios del Grupo de Plantas Medicinales, Departamento de Biociencias, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.

#### 2.3. MATERIALES

##### 2.3.1. Materia prima

Se usó las hojas del árbol de la especie *Erythrina edulis* Triana ex Micheli recolectada en el cantón Chordeleg de la provincia del Azuay.

##### 2.3.2. REACTIVOS

- Metanol para análisis EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur, Merck
- Tween 20
- DZ (5mg/mL)
- Pentobarbital sódico
- Acetato de etilo, Merck
- Ácido acético glacial EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur,
- Tolueno
- Cloroformo grado análisis CAS 67-66-3, Merck
- Dietilamina
- Etanol
- n-Hexano
- Acetona grado análisis ACS,ISO,Reag. Ph Eur, Merck
- Ácido Fórmico
- Dragendorf
- Ninhidrina: 30mg de Ninhidrina disueltos en 10mL de n-Butanol y 0,3mL de ácido acético glacial



- Anizaldehido: 0,5mL de 4-Metoxibenzaldehído para síntesis de la Merck, son mezclados por 10mL de Ácido acético glacial, seguido se coloca 85mL de Metanol y 5mL de Ácido Sulfúrico 95-97%, Sigma Aldrich
- Berlin: 10g de Cloruro Férrico y 0,5g de Ferrocianuro de Potasio se disuelven en 100mL de agua
- 1% de Difenilboriloxietilamina metanólico
- 5% de polietilenglicol-4000 etanólico

### 2.3.3. EQUIPOS

- Horno de secado Pro 3
- Estufa VWR (USA)
- Balanza analítica Mettler Toledo (Suiza)
- Balanza Analítica Boeco BBL-31 (Alemania)
- Rotavapor Heidolph Laborota 4000 Efficient HB digital (Alemania)
- Baño ultrasónico Cole-Palmer 8893-21 (Vernon Hills, Illinois)
- Biofreezer Dairei Freezeer
- Liofilizador Labconco Free zone 2.5 (USA)
- Equipo de fotodocumentación Camag TLC Visualizer, serie N° 200239, Suiza.
- Cabina de extracción de gases Quimis (Brasil)
- Estereomicroscopio Olympus SZX16
- Cámara Olympus E330
- Aireador Air Tech 2K5
- Agitador doble microplacas Grant Bio PMS
- Pipetas Volumétricas Thermo Scientific
- Caja de vidrio sin tapa de 50 x 50cm y 30cm de altura
- Laberinto elevado en cruz
- Aparato de Barra Horizontal

## 2.4. MÉTODOS

### 2.4.1. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

#### 2.4.1.1. Recolección

La especie usada para el estudio (*Erythrina edulis*), se recolectó en la vía Gualaceo – Chordeleg km 13, a una altura de 2332 metros sobre el nivel del mar, cuyas coordenadas



correspondientes son: 2<sup>o</sup>54'4."S, 78<sup>o</sup>46'28.3"W. Se procedió a recolectar el material vegetal (hojas maduras y brotes) según los procedimientos establecidos por la OMS (OMS, 2003). El material fue transportado y almacenado en una bolsa de papel, con la finalidad de protegerlos de la luz. Se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 12°C hasta su posterior procesamiento.

#### **2.4.1.2. Identificación**

La identificación botánica de la planta y certificación de la misma (**anexo 2**), fue realizada en el Herbario de la Universidad del Azuay (UDA) cuyo voucher reposa en el repositorio digital bajo el número 11980 (**anexo 3**). El espécimen fue rotulado para futuras referencias como Sarmiento Zea 001 (SZ001) por el número de recolección.

#### **2.4.1.3. Selección**

Se seleccionó las hojas en mejor estado, eliminando hojas deterioradas, con microorganismos o insectos, al mismo tiempo se eliminaron partículas extrañas y cualquier otro tipo de impureza con la ayuda de una lupa.

#### **2.4.1.4. Lavado**

Después de seleccionada la parte útil de la planta, se procedió al lavado. El proceso se realizó con agua corriente hasta limpieza total, posteriormente se sumergió el material en agua destilada en envases previamente sanitizados por 15 minutos. Por último, se escurrió el exceso de agua en cernidores plásticos y luego en mallas metálicas cubiertas de papel periódico para un escurrido total siguiendo PNT 002 del grupo de plantas medicinales.

#### **2.4.1.5. Secado**

Una vez escurrida la droga se procedió al secado en horno (Pro 3) a una temperatura media de 40°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo y verificando el correcto secado se procedió a pesar la droga seca y al almacenaje en bolsas de papel rotuladas.

#### **2.4.1.6. Trituración**

Trabajando sobre una superficie sanitizada con alcohol etílico (70%), se procedió a triturar manualmente la droga para posteriormente colocarla en una trituradora mecánica, realizando ciclos de 5 segundos, hasta alcanzar un tamaño de 3 a 5mm.



## 2.4.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

### 2.4.2.1. Humectación

Se procedió a colocar la droga ya triturada en envases de vidrio con una cantidad exactamente pesada de alrededor 11g en cada envase con su respectiva rotulación (código, número y peso exacto). Una vez listo se procedió a humectar la droga con una pequeña cantidad de solvente (Metanol para análisis EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur.) y se dejó en reposo en la oscuridad por 15 horas.

### 2.4.2.2. Percolación

Se colocó la droga en el percolador con la ayuda de un embudo y una varilla de vidrio, posteriormente se colocó papel filtro y perlas de vidrio sobre la droga. Se añadió la cantidad necesaria de metanol de tal forma que sobrepase aproximadamente en 1cm a las perlas de vidrio, se mantuvo este nivel de solvente durante todo el proceso de percolación. Se procedió a cubrir el percolador con papel aluminio y se lo dejó en maceración por 24 horas, realizando chequeos frecuentes para asegurar la inexistencia de fugas o salida del líquido. Transcurrido el tiempo se procedió a abrir la llave del percolador fijando la velocidad de salida del extracto a XX gotas por minuto, se recoge la primera fracción (Fracción 1 o F1) de la extracción en un tubo correctamente rotulado, la misma que corresponde a un volumen del 75% del peso total de la droga. Luego de recogida la primera fracción fue guardada en refrigeración y protegida de la luz y se continuó recogiendo el líquido de extracción en un balón fondo redondo. Se realizó la extracción por aproximadamente 8h 48 minutos debido al peso utilizado.

### 2.4.2.3. Agotamiento de la droga

Se comprobó mediante cromatografía de capa fina que haya habido un correcto agotamiento de la droga en el tiempo estimado (**Fig. 2**), para lo cual se realizó un corrimiento del extracto recogido en diferentes tiempos en una placa de sílica gel, se empleó como fase móvil la mezcla de Acetato de etilo:Metanol:Agua en proporción 100:13,5:10. Se procedió a colocar en la fase estacionaria los extractos recogidos a las 2 h, 4h 30min, 7h y 8 horas de iniciada la percolación, se colocaron 8µL de cada extracto con ayuda de una pipeta automática. Una vez corrida la placa se usó el revelador de Productos Naturales.

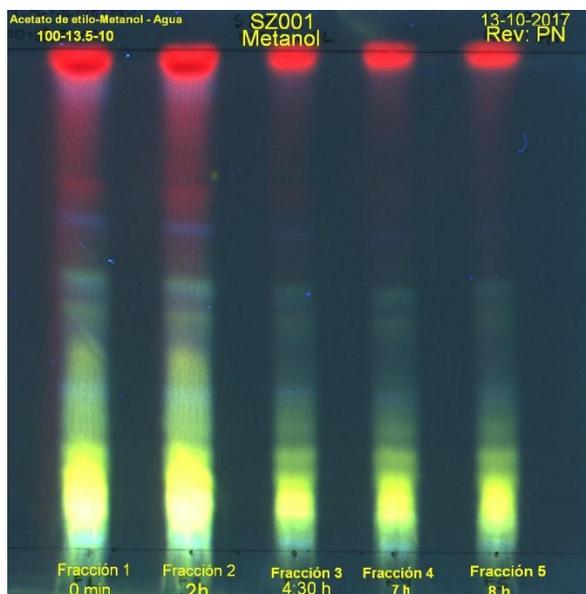


Fig. 2: Agotamiento de la droga vista a 366nm.

#### 2.4.2.4. Concentración del extracto

Cada uno de los balones de fondo redondo que contenían el extracto obtenido de la percolación se adaptaron al Rotavapor Heidolph Laborota 4000 Efficient HB digital (Alemania) y a una temperatura de 27°C se eliminó todo el solvente. La redisolución del extracto del balón se realizó utilizando la fracción 1 en el baño ultrasónico Cole-Palmer 8893-21 (Vernon Hills, Illinois) a una temperatura máxima de 30°C, posteriormente se colocó en un tubo tapa rosca con ayuda de un embudo y se procedió al lavado del balón con la mínima cantidad de metanol hasta disolución total del extracto seco. Seguido de esto el solvente restante se eliminó con Nitrógeno en corriente constante en el baño ultrasónico, hasta la obtención de un volumen aproximado de 3mL.

#### 2.4.2.5. Liofilización

Se procedió al pesaje de cada frasco de liofilización previamente lavado, sanitizado y etiquetado, se trasvasó el contenido de los tubos del paso anterior hacia los frascos para liofilización; pasando todo el contenido con la adición de agua ultra pura, y disolución en baño con ultrasonido Cole-Palmer 8893-21 (Vernon Hills, Illinois) utilizando como máximo 20mL de agua. Una vez listo se tapó el tubo y de forma inclinada se lo sometió a congelación a una temperatura de -80°C, girando los mismos cada 5 minutos, con el fin de conseguir una capa uniforme en torno a las paredes. Una vez congelado



aproximadamente en 20 minutos se retiró el tapón y se lo cubrió con papel aluminio para dejarlo reposar a  $-80^{\circ}\text{C}$  por lo mínimo 2 horas antes de colocar en el equipo.

Una vez listos todos los tubos con el extracto se procedió a colocar en el equipo Liofilizador Labconco Free zone 2.5 (USA) con parámetros de temperatura y presión estén a  $-52^{\circ}\text{C}$  y 0,080 mBar respectivamente. Se deja en estas condiciones las muestras por un tiempo de 20-24 horas. Posteriormente se pasó a tubos o viales, y se almacenaron rotulados como EM SZ001 en el Biofreezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

### **2.4.3. MARCHA FITOQUÍMICA EN CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC)**

Se realizó la investigación de alcaloides, flavonoides, antraquinonas, terpenos, saponinas y taninos en placas de sílica gel previamente activadas (estufa a  $100^{\circ}\text{C}$  por un lapso de 12-15 horas)

#### **2.4.3.1. Preparación de fases móviles**

Se prepararon 7 fases móviles diferentes, utilizadas según el metabolito a investigar las mismas que están detalladas en la Tabla 6. Las fases móviles fueron colocadas en cámaras de vidrio herméticamente cerradas por 15 a 30 minutos antes de la elución de la placa para la saturación completa de la misma.

#### **2.4.3.2. Siembra**

Se sembraron  $8\mu\text{L}$  tanto de patrones, como de muestra (concentración  $5\text{mg/mL}$  en metanol). Se usó como extracto de referencia el de valeriana ( $5\text{mg/mL}$  en metanol). Los patrones usados en las distintas placas están detallados en la Tabla 6. Una vez sembrados se esperó 5 minutos a que éstos secan para continuar con la elución.

#### **2.4.3.3. Elución**

Se procedió a colocar las diferentes placas de forma vertical en las fases móviles indicadas en la tabla 6, de manera constante se vigiló el corrido de la fase móvil hasta su llegada a la línea de frente, en este punto se retiraron las placas de las cámaras, se retiró exceso de eluyente y se las mantuvo dentro de la campana hasta la evaporación completa de la fase móvil. Una vez completamente secas las placas se siguió con la visualización de las mismas en el equipo Camag TLC visualizer (Suiza), se observó la separación de los compuestos y se tomó las fotos respectivas en luz UV a una longitud de onda de 254 nm, 366nm y luz visible.



#### **2.4.3.4. Revelado**

Se utilizaron diferentes reveladores específicos según el metabolito a investigar (Tabla 6) y fueron preparados en base a lo descrito por H. Wagner y S. Bladt en su Atlas de Cromatografía en capa fina (1996). Se colocó al agente revelador en recipientes de vidrio indicados para que toda la placa quede cubierta del mismo, seguido de esto se las retiró y se procedió a secarlas en la campana de evaporación con ayuda de una secadora. Una vez secas las placas se observaron en el Camag TLC visualizer (Suiza) en las diferentes longitudes de onda.

**Tabla 6:** Screening Fitoquímico de *Erythrina edulis*

METABOLITOS	PATRONES	FASE MOVIL	REVELADOR	CONSIDERACIONES ESPECIALES	IDENTIFICACIÓN
<b>ALCALOIDES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cloruro de Harmaline 0,5mg/mL</li> <li>- Cloruro de berbeline 0,25mg/mL</li> <li>- Extracto metanólico de valeriana 5mg/MI</li> </ul>	Acetato de etilo: Metanol: Agua 100:13,5:10	Dragendorf		Visible: café o naranja café
		Acetato de etilo: Metanol: Agua 100:13,5:10	Ninhidrina	Después de tratarla con el revelador, la placa se calienta durante 5-10 min y se evalúa en luz visible.	Visible Efedrina: rojo-violeta
		Tolueno: Acetato de etilo: Dietilamina 70:20:10	Dragendorf		Visible: café o naranja café
		Tolueno: Acetato de etilo: Dietilamina 70:20:10	Ninhidrina	Después de tratarla con el revelador, la placa se calienta durante 5-10 min y se evalúa en luz visible.	Visible Efedrina: rojo-violeta
		Tolueno: Acetato de etilo: Dietilamina 70:20:10	0,5% Yodo en Cloroformo	La placa rociada se calienta a 60°C durante 5min. La placa se evalúa después de 20 minutos en luz visible o en UV 365nm.	365nm - Cefaelina: Fluorescencia azul brillante - Emetina: Fluorescencia amarillo-blanco
<b>FLAVONOIDES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ácido Gálico 0,5mg/mL</li> <li>- Quercetina 1mg/mL</li> </ul>	Acetato de etilo: Ácido fórmico: Ácido acético: Agua 100:11:11:26	Productos Naturales		365nm - Flavonoles: amarillo naranja, amarillo verde - Flavonas: naranja y amarillo verde - Ácidos fenólicos Carboxilicos: azul
<b>ANTRAQUINONAS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aloin 0,5mg/mL</li> <li>- Rehin 0,5mg/mL</li> </ul>	Acetato de etilo: Ácido fórmico: Ácido acético: Agua 100:11:11:26	Productos Naturales:		365nm - Antronas y antranoles: Fluorescencia amarillo intenso.



<b>TERPENOS</b>	- Ácido Oleoico 1mg/mL	Tolueno: Cloroformo: Etanol 40:40:10	Anizaldehido	La placa después de ser tratada con el revelador se calienta a 10°C durante 5-10min, luego se evalúa en luz visible o UV-366nm.	Visible Mono y sesquiterpenos: azul fuerte, verde, rojo y café 365nm Mono y sesquiterpenos: Fluorescencia
	- Esclareol 1mg/mL	Tolueno: Acetato de etilo 85:15	Anizaldehido		
<b>SAPONINAS</b>	- Escina 1mg/mL	Cloroformo: Ácido acético Glacial: Metanol: Agua 64:32:12:8	Anizaldehido	La placa después de ser tratada con el revelador se calienta a 10°C durante 5-10min, luego se evalúa en luz visible o UV-366nm.	Visible: azul, azul violeta, en ocasiones rojo o amarillo café 365nm: fluorescencia azul, violeta o verde.
	- α Hederin 1mg/mL	Acetato de etilo: Metanol: Agua 100:13,5:10	Anizaldehido		
<b>TANINOS</b>	- Extracto metanólico de valeriana 5mg/MI	- Ácido Tanico 0,5mg/mL	Tolueno: Acetona: Ácido Fórmico 60:60:10	Berlín	Se mantienen en el origen, mientras otros compuestos fenólicos migran, los ácidos tánicos dan múltiples marcas según su grado de esterificación

Fuente: (Wagner & Bladt, 1996).



### **1.1.1. TOXICIDAD DEL EXTRACTO DE *Erythrina edulis* EN ARTEMIA SALINA**

Para la determinación de la concentración letal 50 (CL50) se siguió el método descrito por Meyer (1982) y modificado por Molina y colaboradores en 2006 (Molina & Said-Fernández, 2006).

#### **1.1.1.1. Eclosión de los quistes de Artemia salina**

En un recipiente cónico de vidrio se agregó 1L de agua de mar artificial al 4% (40g de sal marina en 1L de agua destilada), complementado con 6mg de levadura seca como alimento para los nauplios y finalmente se adicionaron 100mg de quistes de Artemia salina. A continuación, se procedió a medir el pH para ajustarlo a 8,5 con aproximadamente XXV gotas de NaOH 0,2N con la finalidad de asegurar la supervivencia de las Artemias. Se suministró una corriente de aire a través de una bomba y se adicionó un calentador de agua para obtener una temperatura constante de  $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ . Se cubrió el sistema con una cartulina negra dejando al descubierto la parte superior del recipiente que durante todo el proceso se mantuvo iluminado con ayuda de dos lámparas de luz blanca. Se dejó incubar por 36 horas y se inició la recolección (Molina & Said-Fernández, 2006).

#### **1.1.1.2. Recolección de las larvas**

Aprovechando el fototropismo que presentan las Artemias se enfocó una de las lámparas en la parte superior del recipiente con el objetivo de agrupar los nauplios eclosionados, de esta forma fueron colectados y transferidos a una caja petri con la ayuda de una pipeta volumétrica de 10mL para su posterior uso.

#### **1.1.1.3. Toxicidad en Artemia salina**

##### **Preparación de los extractos para el ensayo de toxicidad**

Para la preparación de las soluciones del extracto de *Erythrina edulis* se utilizó como vehículo agua de mar artificial (4%) más Tween 20 (1%). Se trabajó con concentraciones de 25000, 22500, 20000, 17500, 15000, 12500 $\mu\text{g/ml}$ .

##### **Preparación de la microplaca**

El ensayo se efectuó en una placa estéril de 96 pocillos de fondo plano (Costar 3590). En los pocillos de la periferia se colocaron 200 $\mu\text{L}$  de agua de mar artificial, con la finalidad de controlar la evaporación de los pocillos de prueba. En los pocillos restantes con la ayuda



de una pipeta automática se colocaron  $10 \pm 3$  nauplios de *Artemia* contenidos en  $100\mu\text{l}$  de agua de mar artificial. Y la distribución de los pocillos se realizó de la siguiente manera:

- **Primera columna de 6 pocillos**, se colocó  $100\mu\text{L}$  de vehículo en agua de mar artificial (4%) más Tween 20 al 1 % como control negativo.
- **Segunda columna de 6 pocillos**, se colocó  $100\mu\text{L}$  de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  a una concentración de 400ppm como control positivo.
- **Tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima y octava columna de 6 pocillos**, se colocó  $100\mu\text{L}$  del extracto de *Erythrina edulis* en las concentraciones indicadas en el punto anterior. La Microplaca se colocó en el agitador de placas (Mini Shaker Grant Bio, modelo PMS 1000) en velocidad media por 10 minutos para una homogeneización total del extracto en los pocillos. Se incubó la placa bajo luz suave a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$  por 24 horas. Pasado el tiempo, se realizó la observación de los nauplios en un estereomicroscopio (Olympus SZX16). Se realizó el conteo de las larvas que permanecieron inmóviles durante 10 segundos las cuales se consideraron muertas. Para determinar el número total de larvas por pocillo se agregó  $50\mu\text{L}$  de metanol absoluto a cada pocillo y después de 15 minutos se procedió al conteo total de nauplios por pocillo.

#### **Determinación de la concentración letal (CL50)**

Una vez obtenido los datos del ensayo, se determinó la concentración en la cual se produjo la muerte de la mitad de los organismos de prueba o CL50 y se comparó con el índice de toxicidad de Clarkson (Clarkson, et al., 2004), que clasifica a la toxicidad de los extractos según las siguientes categorías:

- CL50 superior a  $1000\mu\text{g}/\text{mL}$  = no tóxicos
- CL50 entre  $500\text{-}1000\mu\text{g}/\text{mL}$  = baja toxicidad
- CL50 entre  $100\text{-}500\mu\text{g}/\text{mL}$  = medio tóxicos
- CL50 entre  $0\text{-}100\mu\text{g}/\text{mL}$  = altamente tóxicos.



## 1.1.2. ENSAYOS FARMACOLÓGICOS *IN VIVO*

### 1.1.2.1. Animales de experimentación

Los animales usados en los experimentos fueron ratones machos Swiss CD1 de peso comprendido entre 28-32g, obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública con sede en la ciudad de Guayaquil. Una vez traídos los animales fueron colocados en las instalaciones del laboratorio-bioterio del grupo de investigación de plantas medicinales, se le mantuvo con un fotoperiodo de 12h de luz y 12h de oscuridad a temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Los ratones estaban dispuestos en jaulas en grupos de tres a cuatro con agua y alimento ad libitum. Se aclimataron al lugar en un periodo de una semana para su uso posterior.

### 1.1.2.2. Grupos de animales de experimentación

Antes de la realización de cada prueba los animales tuvieron ayuno durante un período de 15 h y se aclimataron al ambiente de ensayo durante mínimo 30 minutos antes de la experimentación (Santos, Viana, Cunha, Campos, & Da Costa, 2015). Se dividieron los ratones en grupos de 6 de manera aleatoria en cada metodología se usaron cinco grupos distribuidos de la siguiente forma:

- **Grupo 1 o grupo control negativo:** tratados con vehículo en proporción de 10mL/Kg de peso. El vehículo usado en los ensayos fue agua destilada más Tween 20 al 1 %.
- **Grupo 2 o grupo control positivo:** tratados con DZ en dosis de 1mg/Kg de peso.
- **Grupo 3,4,5 o grupos prueba:** tratados con el extracto metanólico de hojas de *Erythrina edulis* a una dosis de 500, 250 y 125 mg/kg de peso respectivamente.

La vía de administración fue intraperitoneal. Los ensayos fueron realizados en varios días en el mismo periodo que corresponde de 8am a 1pm.

### 1.1.2.3. Preparación de los extractos para las pruebas

La preparación de las diferentes dosis del extracto se realizó a partir del extracto liofilizado almacenado en el Biofreezer Dairei Freezer. Como vehículo se utilizó agua destilada más Tween 20 al 1 %. Se prepararon concentraciones de 50, 25 y 12,5mg/mL.



#### **1.1.2.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SEDANTE**

Para la determinación de la actividad sedante se realizaron dos técnicas, las cuales fueron:

##### **Potenciación del sueño con Pentobarbital sódico**

###### **- Descripción de la técnica**

Los animales fueron dispuestos en jaulas individuales para su observación. El pentobarbital se usó a una dosis de 40mg/Kg de peso (4mg/mL en agua destilada más tween 20 al 1%). Se administró vía intraperitoneal el vehículo, DZ (1mg/Kg) y el extracto a dosis de 500, 250 y 125mg/Kg de peso según el grupo correspondiente y treinta minutos después se les inyectó Pentobarbital (40mg/kg) a todos los sujetos de estudio.

Se tomó el tiempo que tarda el animal en perder el reflejo de enderezamiento (tiempo de latencia) y el tiempo que tarda en recuperarlo (tiempo de sueño). Los ratones cuyos tiempos de latencia sobrepasaron los 15 minutos fueron excluidos del experimento (De la Peña, et al., 2017).

##### **Prueba de tracción**

###### **- Descripción de la técnica**

Se realizó en un aparato que consta de una barra metálica dispuesta de forma horizontal de 38cm de longitud y de un diámetro de 2mm sostenido de dos barras de 49cm de longitud (Deacon, 2013). El ensayo consiste en tomar al ratón por la cola y dejar que el mismo tome la barra de metal en el punto central con sus patas delanteras, a continuación, se suelta la cola del ratón y se mide el tiempo que tarda en colocar la pata trasera en la barra o en caer. El tiempo de corte de la prueba correspondió a 30 segundos. Antes de la realización del ensayo se probó si los animales eran aptos para el mismo, para esto se debe comprobar si el ratón es capaz de atrapar la barra metálica con las extremidades traseras en 5 segundos o menos. La prueba se realizó con los grupos a los 30, 60 y 90 minutos post inyección para valoración del efecto de la droga sobre la función neuromuscular en el tiempo.

#### **1.1.2.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA**

Para la determinación de la actividad ansiolítica se realizaron dos técnicas, las cuales fueron:



## **Campo Abierto (Open Field)**

### **- Descripción de la técnica**

El aparato consiste en una estructura cúbica descubierta de vidrio con una dimensión de 50cm de largo por 30cm de alto. La base del campo abierto es de color blanco y está dividido en cuadrados de 10cm (Seibenhener & Wooten, 2015). En el mismo se encuentran demarcados dos cuadrantes principales, un externo que contiene 16 cuadrados delimitados por las paredes del aparato y un interno que contiene 9 cuadrados incluyendo el central, el cual a su vez se encuentra delimitado con bordes rojos.

Treinta minutos después de la administración intraperitoneal, los animales de experimentación fueron expuestos al laberinto de manera individual durante 5 minutos, tiempo durante el cual fueron filmados para evitar respuestas inducidas por los investigadores. Los comportamientos evaluados fueron el número de líneas cruzadas, el número de estiramientos verticales (rearings), tiempo de permanencia en el cuadrante interno y número de entradas al cuadro rojo central.

## **Laberinto elevado en cruz**

### **- Descripción de la técnica**

El laberinto se encuentra elevado a 50cm del piso y consta de cuatro brazos de 25cm de largo por 5cm de ancho, de los cuales dos son abiertos y dos cerrados por una pared de 16cm de alto.

Treinta minutos después de la administración intraperitoneal los animales de experimentación fueron llevados al centro del aparato. Los ratones fueron filmados por 5 minutos y se valoraron los siguientes comportamientos: tiempo de permanencia en los brazos abiertos y cerrados, así como el número de entradas a los brazos abiertos y en los brazos cerrados (Bailey & Crawley, 2009).

### **1.1.3. Análisis Estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo con el software "R" versión 3.4.3 de 64 bits. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar. Los datos para los ensayos farmacológicos *in vivo* se analizaron usando ANOVA de una vía seguido por la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Para el ensayo de toxicidad se utilizó el



método estadístico de análisis de regresión lineal usando análisis Probit de Finney. Los resultados se consideraron significativos con  $P < 0.05$ .



## CAPITULO 3

### 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se exponen los resultados más relevantes de la investigación:

#### 2.1. Rendimiento del extracto metanólico de *Erythrina edulis*

El rendimiento se expresa mediante la relación de la droga seca y el extracto nativo. El extracto metanólico de hojas de *Erythrina edulis* tuvo el siguiente rendimiento:

$$DER \text{ nativo} = \frac{\text{Peso de materia seca}}{\text{Peso del liofilizado}}$$

$$DER \text{ nativo} = \frac{11,04\text{g}}{1,23789\text{g}}$$

$$DER \text{ nativo} = 8,91 \sim 9$$

$$DER \text{ nativo} = 9:1$$

El rendimiento obtenido fue 9:1, lo que significa que para obtener 1g de liofilizado se necesita 9g de droga seca.

#### 2.2. Marcha fitoquímica en Cromatografía de Capa Fina (TLC)

Según lo expuesto en la **Tabla 7**, se usaron múltiples fases móviles y reveladores para indagar la presencia de alcaloides, flavonoides, antraquinonas, terpenos, saponinas y taninos en el extracto metanólico de hojas de *Erythrina edulis*. La caracterización de los metabolitos se basó en las manchas de color y fluorescencia formadas en cada uno de los cromatogramas vistas a diferentes longitudes de onda y luz visible, dando los siguientes resultados:

**Tabla 7:** Marcha Fitoquímica en TLC de extracto metanólico de *Erythrina edulis*.

GRUPO INVESTIGADO	FASE MÓVIL	REVELADOR	RESULTADO
ALCALOIDES	Acetato de etilo: Metanol: Agua 100:13,5:10	Dragendorf	Negativo
	Acetato de etilo: Metanol: Agua 100:13,5:10	Ninhidrina	Negativo
	Tolueno: Acetato de etilo: Dietilamina 70:20:10	Dragendorf	Negativo
	Tolueno: Acetato de etilo: Dietilamina 70:20:10	Ninhidrina	Negativo
	Tolueno: Acetato de etilo: Dietilamina 70:20:10	0,5% Yodo en Cloroformo	Negativo
FLAVONOIDES	Acetato de etilo: Ácido fórmico: Ácido acético: Agua 100:11:11:26	Productos Naturales	Posible Presencia de abundantes Flavonoles, flavonas y ácidos fenólicos carboxílicos
ANTRAQUINONAS	Acetato de etilo: Ácido fórmico: Ácido acético: Agua 100:11:11:26	Productos Naturales:	Posible presencia de antronas y antranoles
TERPENOS	Tolueno: Cloroformo: Etanol 40:40:10	Anisaldehido	Posible presencia de mono y sesquiterpenos por la coloración verde presente.
	Tolueno: Acetato de etilo 85:15	Anisaldehido	
SAPONINAS	Cloroformo: Ácido acético Glacial: Metanol: Agua 64:32:12:8	Anisaldehido	Posible presencia de saponinas por las coloraciones azules observadas.
	Acetato de etilo: Metanol: Agua 100:13,5:10	Anisaldehido	
TANINOS	Tolueno: Acetona: Ácido Fórmico 60:60:10	Berlín	Presencia de Taninos hidrolizables.



El extracto metanólico de hojas de *Erythrina edulis* analizado en TLC no muestra la presencia de alcaloides, sin embargo la literatura reporta la presencia de alcaloides cuaternarios tipo isoquinolina en especies de este género, que no se visualizan por esta técnica (Amer, Shamma, & Freyer, 1991).

Se pudo evidenciar la presencia de abundantes flavonoides, sin embargo, ninguno de estos correspondía a los patrones utilizados: quercetina y ácido gálico (como ácido fenólico). Se puede apreciar en la **Fig. 34** del **anexo 5** siete bandas claramente diferenciables con un Rf de 0,13; 0,19; 0,23; 0,27; 0,5 y 0,62 de las cuales las marcas de color amarillo se podrían tratar de flavonoles y las de color amarillo verde posibles flavonas, seguido se observa un color azul con un Rf de 0,35 que corresponde a presencia de ácidos carboxílicos fenólicos.

En la **Fig. 35** del **anexo 5** se observan abundantes bandas de color amarillo que posiblemente se deba a la presencia de antronas y antranoles.

En lo referente a terpenos con el revelador de Anizaldehido-Ácido Sulfúrico en la **Fig. 36** del **anexo 5** se observa una coloración azul en las bandas correspondientes a los patrones ácido oleanólico y esclareol que no se presentan en la muestra por lo que se descarta su presencia, sin embargo, se observa una banda de color verde con un Rf de 0,81 que puede tratarse de la presencia de aceites esenciales de tipo mono y sesquiterpenos. La misma coloración verde se hace presente en la segunda placa **Fig. 37** con un Rf de 0,67 que soporta esta afirmación.

En el revelado de placas de Saponinas en la **Fig. 38** del **anexo 5** se logra visualizar a 366nm coloraciones azules con un Rf de 0,70 0,76 0,81 y 0,86 y en la **Fig. 40** del **anexo 5** una coloración azul con un Rf de 0,13 0,17 0,30 0,45 y 0,63. Se concluye que hay la posibilidad de que la muestra presente saponinas, sin embargo ninguna de estas corresponden a los patrones estudiados, Escina y  $\alpha$ -Hederin.

Por ultimo en la prueba específica para la determinación de taninos, se usa como revelador el reactivo Berlín y se observa en la **Fig. 41** del **anexo 5** la presencia de posibles taninos hidrolizables, pues los mismos tienden a quedarse en la línea de siembra (Lea, 1978).



### 2.3. TOXICIDAD DEL EXTRACTO METANÓLICO DE HOJAS DE *Erythrina edulis* EN ARTEMIA SALINA

Los datos obtenidos en el ensayo de toxicidad están contenidos en la Tabla 8.

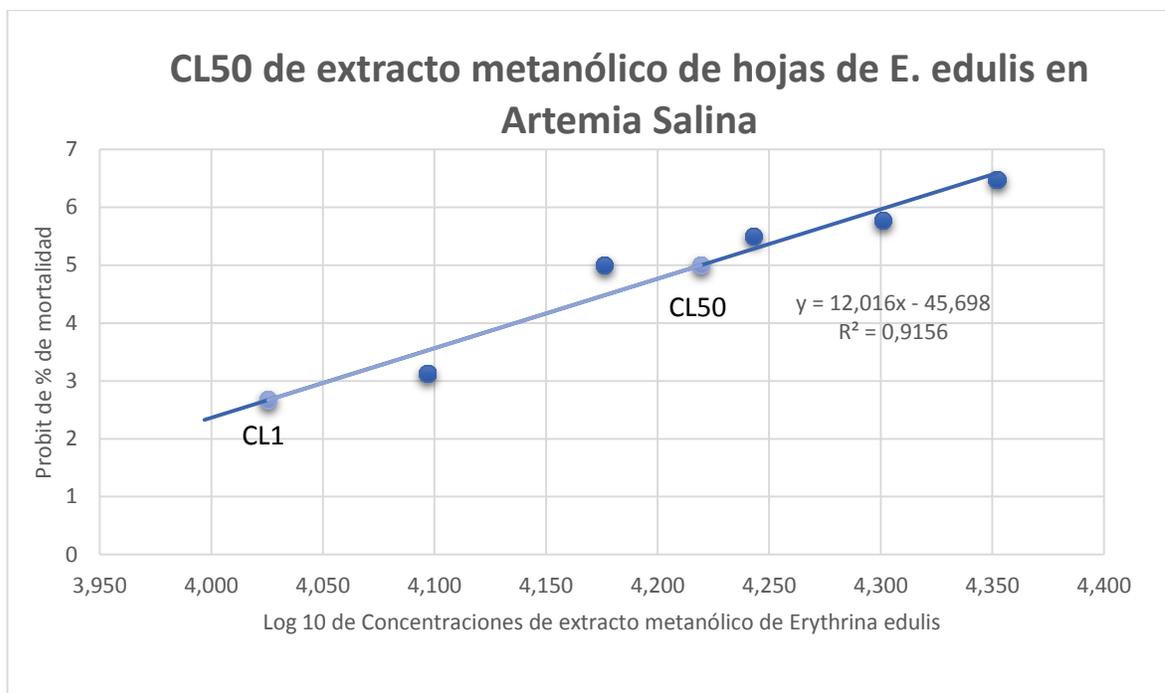
**Tabla 8:** Toxicidad del extracto metanólico de hojas de *Erythrina edulis* en Artemia Salina aplicando análisis Probit

Dosis (ug/mL)	Log Dosis	Número total de nauplios	Número de nauplios muertos	% de Mortalidad	Probit
25000	4,097	65	65	100	-
22500	4,176	68	63	93	6,48
20000	4,243	69	54	78	5,77
17500	4,301	67	46	69	5,5
15000	4,352	70	35	50	5
12500	4,398	64	2	3	3,12

Como anteriormente se mencionó, se utilizó como referencia el índice de Clarkson para medir la toxicidad del extracto en Artemia Salina (Clarkson, et al., 2004). El extracto metanólico de hojas de *Erythrina edulis* muestra un CL50 de 16571,78µg/mL, observable en la **Tabla 9**, correspondiente a una toxicidad nula en Artemia. Se trabajó con valores de significancia de  $p < 0,05$ .

**Tabla 9:** CL50 del extracto metanólico de hojas de *Erythrina edulis* en Artemia salina

Extracto	Ecuación de la regresión lineal	Valor de CL50 (ug/mL)
Extracto metanólico de <i>Erythrina edulis</i>	$y = 12,0x + (-45,70)$	16571,7828



**Fig. 3:** Obtención de CL50, CL1 y CL99 por interpolación de la relación lineal de Probit y Log10 de la concentración del extracto.

En la **Fig. 3**, gracias a la gráfica de regresión lineal se pudo realizar una interpolación para determinar el CL1 y el CL99, es decir la concentración a la cual se produce la muerte del 1 y 99% de la población respectivamente. Dichos valores corresponden a concentraciones de CL1= 10603,65µg/mL y CL99=25899,02µg/mL.

La prueba de toxicidad en *Artemia salina* es una de las opciones más viables en el campo de investigación y descubrimiento de potenciales extractos naturales, la misma que incluso puede sustituir a ensayos de toxicidad en animales superiores, resolviendo de esta forma las involucraciones éticas en las que se ven envueltas estas experimentaciones (Hamidi, Jovanova, & Panovska, 2014). Lagarto y colaboradores han recopilado la CL50 en *Artemia* y la DL50 en ratas y ratones de numerosos extractos vegetales, encontrando en ellos una correlación positiva, validando de esta forma al ensayo como una buena alternativa para una prueba preliminar de toxicidad en humanos (Hamidi, Jovanova, & Panovska, 2014; Lagarto, Silva, Guerra, & Iglesias, 2001).

La nula toxicidad encontrada en el extracto metanólico de hojas *Erythrina edulis*, permite considerar al espécimen como un buen candidato para el estudio de sus potenciales efectos farmacológicos al avalar su uso seguro conseguido al determinar su toxicidad,



además de que esto permite trabajar en un intervalo de dosis grande en roedores, pues usando la prueba de Spearman presentada en la metodología de Largarto y colaboradores para la correlación CL50-DL50 (dosis letal 50) se obtiene un presunto DL50 comprendido entre 1,004 y 1,83g/Kg de peso de ratón (Lagarto, Silva, Guerra, & Iglesias, 2001).

## 2.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SEDANTE

### 2.4.1. POTENCIACIÓN DEL SUEÑO CON PENTOBARBITAL SÓDICO

En esta prueba nos muestra que el diazepam produjo una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) en el tiempo de latencia y un claro aumento ( $p < 0.001$ ) en el tiempo de dormición en comparación con el grupo control (tratado con vehículo). En contraposición ninguna dosis del extracto de *E. edulis* presenta una respuesta significativa en el tiempo de latencia (**Fig. 4**), mientras que la dosis de 250mg/Kg y 500mg/Kg producen una respuesta significativa ( $p < 0.01$ ) en el tiempo de dormición provocando una disminución del mismo en comparación con el grupo control. Los resultados obtenidos se encuentran expresados en la **Tabla 10**.

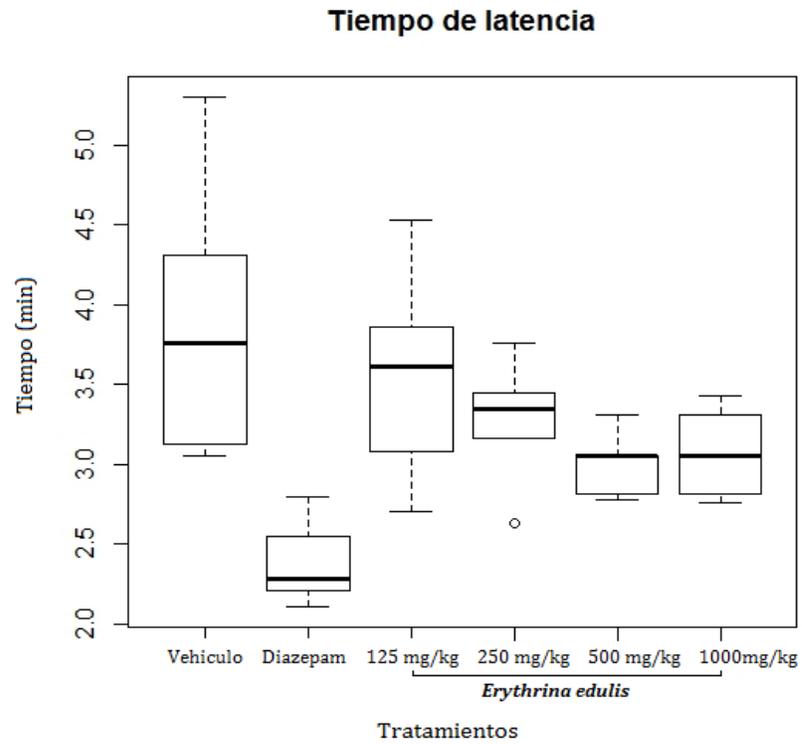
**Tabla 10:** Efecto del extracto metanólico de hojas de *Erythrina edulis* en la prueba de inducción del sueño con Pentobarbital sódico.

Tratamiento	Dosis (mg/kg de peso)	Tiempo de Latencia	Tiempo de dormición
Vehículo	1mL	3,89 ± 0,84	38,98 ± 4,96
Diazepam	0,1	2,39 ± 0,28**	58,07 ± 2,40**
<i>Erythrina edulis</i>	125	3,56 ± 0,71	37,98 ± 3,23
<i>Erythrina edulis</i>	250	3,28 ± 0,38	30,21 ± 3,50*
<i>Erythrina edulis</i>	500	3,01 ± 0,19	30,85 ± 3,19*
<i>Erythrina edulis</i>	1000	3,07 ± 0,27	45,69 ± 5,36

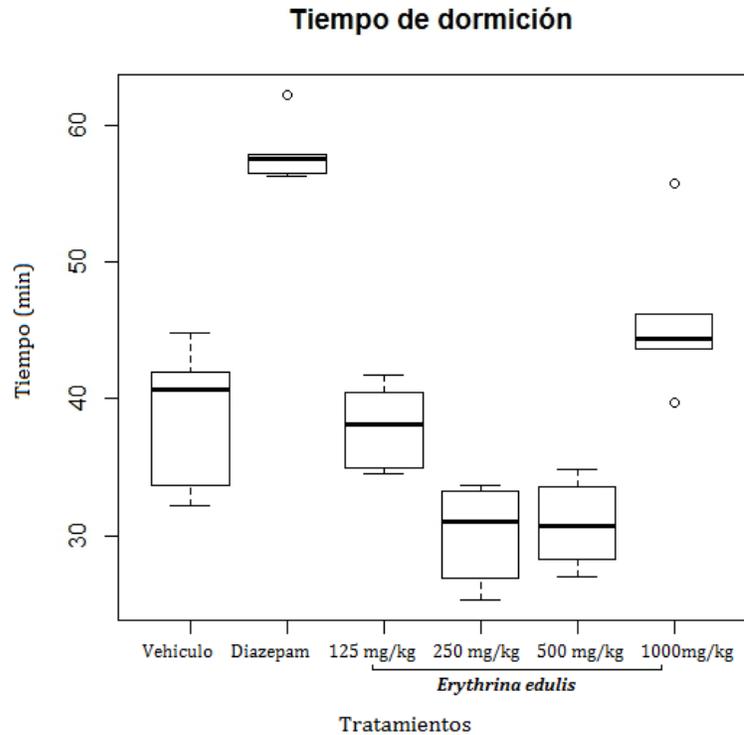
Media ± desviación estándar de 6 determinaciones. Significancia: \*\*  $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,01$ .

La Prueba de potenciación del sueño con pentobarbital es una de las pruebas mayormente usadas para demostrar la actividad sedante de una sustancia. Como bien es conocido una droga depresora del SNC produce la disminución del tiempo de latencia y el aumento del tiempo de dormición. En el caso del extracto de *E. edulis* no se observa diferencias significativas frente al grupo control, con la excepción de la dosis de 250 y 500mg/Kg en la cual se evidencia un efecto contrario al esperado pues disminuye el tiempo de dormición (**Fig. 5**). Lo observado puede atribuirse a varias razones como, que la droga tenga propiedades estimulantes del SNC, que presente interacción de tipo antagónico con el pentobarbital o que el extracto es de tipo inductor del citocromo P450,

que se sabe que este sistema es responsable del metabolismo del pentobarbital (Goloubkova, Heckler, Ratesb, Henriquesa, & Henriquesb, 1998).



**Fig. 4:** Tiempo de latencia del ensayo de potenciación del sueño con pentobarbital sódico.



**Fig. 5:** Tiempo de sueño del ensayo de potenciación del sueño con pentobarbital sódico.

#### 2.4.2. Prueba de Tracción

En esta prueba el diazepam fue el único agente administrado que produjo un aumento significativo ( $p < 0.001$ ) en el tiempo de reincorporación en las tres exposiciones al aparato en los periodos de 30, 60 y 90min. Se observa que la dosis de 125 y 250mg/Kg disminuyen el tiempo de restablecimiento en comparación al grupo control (vehículo) de manera significativa ( $p < 0.001$  y  $0.01$ ) en la primera exposición (30min). Sucede lo mismo con las dosis de 250 y 500mg/Kg en la segunda exposición (60min) con una significancia de  $p < 0.01$ . A los 90 minutos no existe diferencia significativa entre las dosis administradas de *E. edulis* con respecto al grupo control, como se puede observar en la **Tabla 11**.



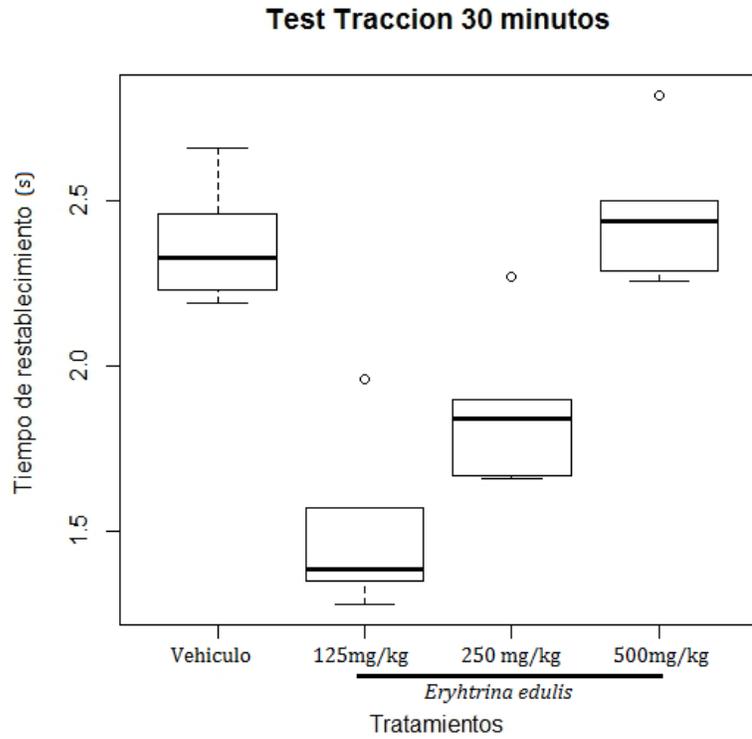
**Tabla 11:** Efecto del extracto metanólico de hojas de *Erythrina edulis* en la prueba de Tracción.

Tratamiento	Dosis (mg/kg de peso)	Tiempo de restablecimiento		
		30min	60min	90min
Vehículo	1mL	2,37 ± 0,17	4,45 ± 0,32	1,85 ± 0,32
Diazepam	0,1	29,56 ± 0,72**	29,67 ± 0,52	29,82 ± 0,29
<i>Erythrina edulis</i>	125	1,49 ± 0,25**	3,23 ± 1,76	1,63 ± 0,09
<i>Erythrina edulis</i>	250	1,86 ± 0,22*	2,32 ± 0,35*	1,76 ± 0,19
<i>Erythrina edulis</i>	500	2,46 ± 0,20	2,54 ± 0,34*	1,67 ± 0,19

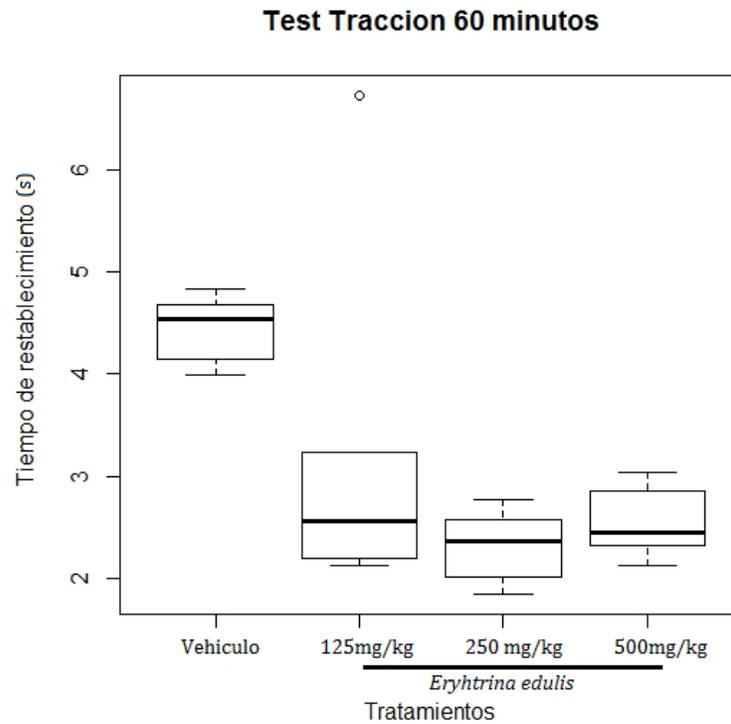
Media ± desviación estándar de 6 determinaciones. Significancia: \*\* p<0,001; \* p<0,01.

La prueba de tracción tiene como función evaluar de forma directa la fuerza muscular o la función neuromuscular en los roedores, utilizando el reflejo de restablecimiento como pauta para conocer el nivel de sedación. Este ensayo se realizó como complemento a la prueba de potenciación del sueño con pentobarbital sódico, pues para conocer el efecto sedante de un compuesto es necesario conocer si solo se produce hipnosis o relajación muscular o se presentan en conjunto. En esta prueba los ratones que están expuestos a una droga con efecto sedante no tienen la capacidad de reestablecerse o lo hacen en tiempos superiores a los del grupo control a lo largo de las 3 exposiciones (Sanchez, 1962). Los ratones expuestos al extracto metanólico de las hojas de *E. edulis* no solo no presentan esta característica, sino que en la primera exposición (30min) las dosis de 125 y 250mg/Kg los ratones se restablecen en un tiempo menor (**Fig. 6**) y este comportamiento se repite en la segunda exposición (60min) (**Fig. 7**) en la dosis de 250mg/Kg y aparece en la dosis de 500mg/Kg; descartando de esta forma que el extracto sea un relajante muscular.

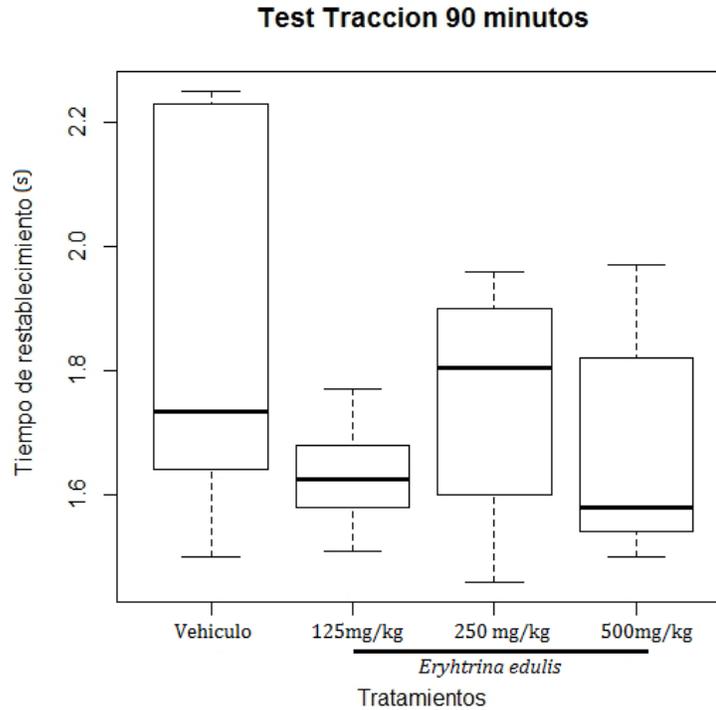
Como se observó en la prueba de potenciación del sueño con pentobarbital el extracto produce una acción opuesta a la sedación, lo que sugiere una posible estimulación del SNC por parte del extracto.



**Fig. 6:** Prueba de Tracción a los 30 minutos de inyección i.p.



**Fig. 7:** Prueba de Tracción a los 60 minutos de inyección i.p.



**Fig. 8:** Prueba de Tracción a los 90 minutos de inyección i.p.

## 2.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA

### 2.5.1. PRUEBA DE CAMPO ABIERTO

Los resultados expuestos en la **Tabla 12** demuestran que *E. edulis* en dosis de 125 y 500 mg/Kg aumenta significativamente ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ) el número de líneas cruzadas al ser comparadas con el control (vehículo). En contraste, el diazepam produce una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) de líneas cruzadas. Todas las dosis administradas 125, 250 y 500mg/Kg de *E. edulis* aumentaron significativamente ( $p < 0,001$ ) el número de entradas al cuadrante central al ser comparados con el grupo control. El diazepam no muestra un aumento significativo ( $p > 0,05$ ) de entradas y tampoco existe una diferencia significativa entre las dosis de *E. edulis* y diazepam.

Existe una disminución significativa del número de rearings asistidos ( $p < 0.001$ ) en las dosis de 125, 250mg/Kg ( $p < 0.001$ ) y de 500mg/Kg ( $p < 0.01$ ) de *E. edulis* al ser comparado con el grupo control lo que de igual forma se observa con el diazepam ( $p < 0.001$ ).



El diazepam es el único grupo en el que se pudo observar una disminución significativa ( $p < 0,01$ ) de rearings no asistidos. En cuanto al tiempo de permanencia en el cuadrante interno a pesar de que se observa un aumento en los grupos tratados con el extracto y el diazepam, este no es estadísticamente significativo.

**Tabla 12:** Efecto del extracto metanólico de hojas de *Erythrina edulis* en la prueba de Campo abierto

Tratamiento	Dosis (mg/kg de peso)	Número de líneas cruzadas	Número de entradas al cuadrante central	Tiempo de permanencia en cuadrante interno	Rearing asistido	Rearing no asistido
Vehículo	1mL	139,33 ± 8,96	2,50 ± 0,84	39 ± 3,90	50,17 ± 4,83	7,83 ± 1,47
Diazepam	0,1	107,67 ± 10,73**	5,17 ± 1,60	52,33 ± 7,20	15,17 ± 3,37***	1,17 ± 1,94*
<i>Erythrina edulis</i>	125	162,83 ± 10,25**	7,83 ± 1,6**	52,33 ± 2,66	36,33 ± 8,38**	7 ± 0,89
<i>Erythrina edulis</i>	250	150,17 ± 10,34	8,5 ± 2,17**	58 ± 15,71*	35,33 ± 3,56**	5 ± 3,16
<i>Erythrina edulis</i>	500	197,17 ± 6,97***	8,17 ± 2,64**	53 ± 8,37	36,67 ± 4,32*	7,67 ± 5,61

Media ± desviación estándar de 6 determinaciones. Significado de los códigos 0 '\*\*\*'; 0,001 '\*\*'; 0,01 '\*'; 0,05 '.'; 0,1 '.'; 1

El campo abierto es uno de los aparatos más utilizados para la evaluación de la emocionalidad en roedores, pues lo enfrenta a un espacio desconocido iluminado y amplio. La exposición del animal a un ambiente *de novo* produce respuestas de miedo y ansiedad alterando su comportamiento y locomoción (Bailey & Crawley, 2009; Ajao & Akindele, 2013).

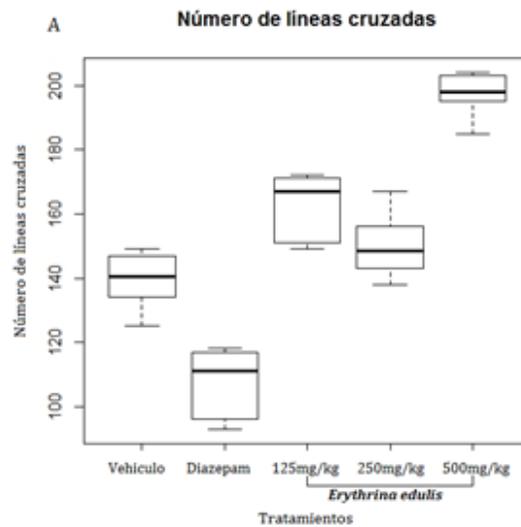
Con estos antecedentes se sabe que el número de líneas cruzadas es un indicativo de la actividad locomotora y es usado para medir a grosso modo la actividad sedante en los roedores (Khatoun, Khatun, Islam, & Parvin, 2014; Foyet, Tsala, Bouba, & Hritcu, 2012). Foyet y colaboradores definen al parámetro como movimiento horizontal y a su vez explican que su incremento es indicador de una estimulación en el SNC. El número de entradas al cuadrante central es un indicador de comportamiento exploratorio y por tanto evidencia niveles bajos de ansiedad estando relacionado íntimamente con el tiempo de permanencia en el cuadrante interno debido al espacio físico del aparato en donde se los mide (Bailey & Crawley, 2009; Colin, Burton, & O'Keefe, 2006; Foyet, Tsala, Bouba, & Hritcu, 2012)



La significancia del tiempo de permanencia en el cuadrante interno parte de un comportamiento denominado como tigmotaxis que hace referencia a la influencia que tiene un objeto sólido sobre el comportamiento del roedor, en este caso son las paredes del aparato las que proveen un área segura incitándolos a mantenerse cerca de ellas convirtiendo a la tigmotaxis en un indicativo de niveles de ansiedad elevada. Por esto, este parámetro es de gran importancia debido a que solo los roedores sin comportamientos ansiosos presentan tiempos elevados (Seibenhener & Wooten; Lamprea, Cárdenas, Setem & Morato, 2008).

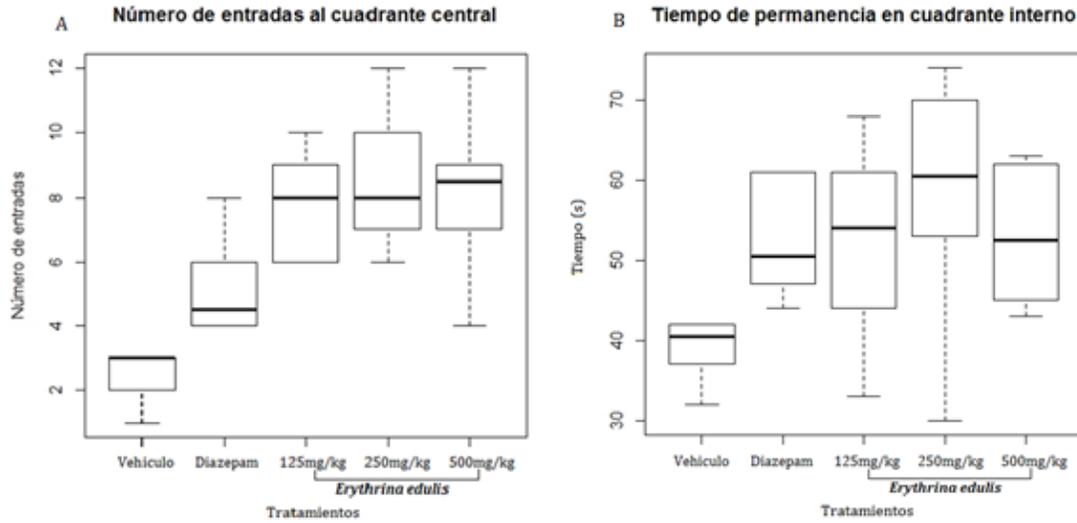
Finalmente, el ultimo parámetro a analizar es el movimiento vertical conocido como rearing, un efecto ansiolítico se ve reflejado cuando disminuyen los rearing asistidos y aumentan los rearing no asistidos ya que reflejan un comportamiento de huida y de exploración respectivamente (Bailey & Crawley, 2009; Colin, Burton, & O'Keefe, 2006).

Las dosis del extracto de *E. edulis* de 125 y 500mg/Kg aumentan significativamente el número de líneas cruzadas (**Fig. 9**) lo que sugiere que el extracto produce una estimulación en SNC y descarta a su vez que el extracto pueda tener un efecto de tipo sedante. Se evidencia también que el diazepam produce una disminución en la locomoción lo que se podría confundir con un comportamiento ansioso de los roedores. Sin embargo, se han reportado resultados similares con respecto al fármaco en otros estudios que involucran al ensayo de campo abierto donde atribuyen estas respuestas al hecho de que el efecto sedante predomina sobre el efecto ansiolítico a la dosis ensayada de 1mg/Kg (Foyet, Tsala, Bouba, & Hritcu, 2012; Ajao & Akindede, 2013) y de 0.5mg/Kg (Kishore, N., Anjaneyulu, M., Ganesh, M. & Sravya, N., 2012).



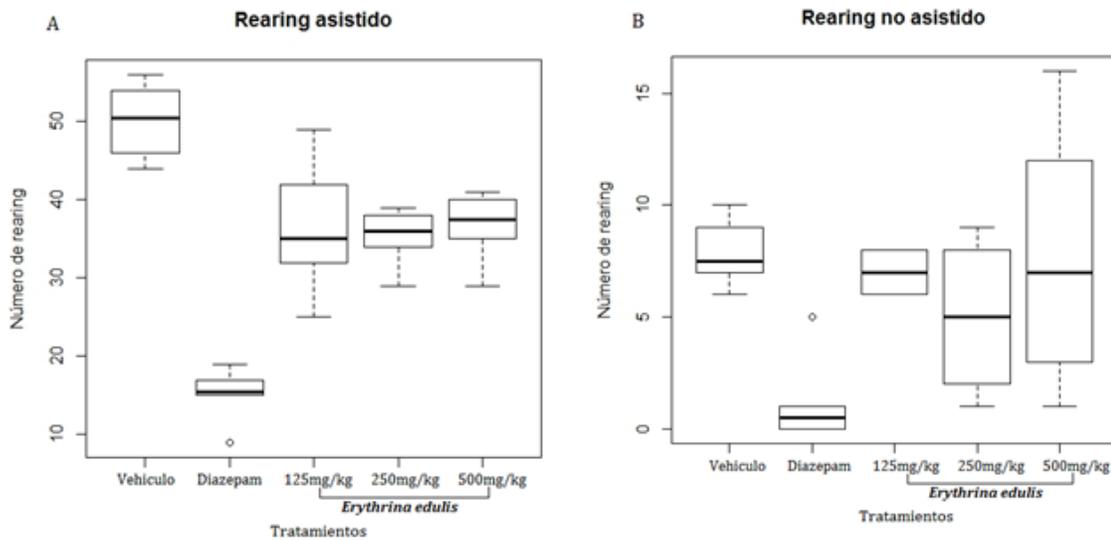
**Fig. 9:** Número de líneas Cruzadas en campo abierto.

A pesar de que el tiempo de permanencia no se ve aumentado por el extracto **Fig. 10 (B)**, el resto de parámetros obtenidos del campo abierto sugieren una acción ansiolítica. Haciendo mención especial al número de entradas al cuadrante central **Fig. 10 (A)** en donde se observa claramente que todas las dosis de *E. edulis* aumentan este comportamiento, poniendo de esta forma a los roedores lejos de las paredes del aparato disminuyendo indirectamente el comportamiento de tigmotaxis, compensando la falta de aumento en el tiempo de permanencia que se hubiera esperado del extracto (Foyet, Tsala, Bouba, & Hritcu, 2012).



**Fig. 10:** (A) Número de entradas al cuadrante central en campo abierto. (B) Tiempo de permanencia en cuadrante interno en campo abierto.

Otro parámetro que ayuda a soportar anteriores conclusiones es el número de rearing asistidos, este se ve disminuido por las dosis de *E. edulis* (**Fig. 11 A**) lo que demuestra una disminución en el comportamiento de huida reflejando un comportamiento menos ansioso.



**Fig. 11:** (A) Número de rearings asistidos en campo abierto. (B) Número de rearings no asistidos en campo abierto



### 2.5.2. LABERINTO ELEVADO EN CRUZ

En la **Tabla 13** se aprecia que el número de entradas a brazos abiertos se ve significativamente aumentada  $p < 0.001$  para las dosis de 125 y 250 mg/Kg, a la vez que las dosis de 125 y 250 mg/Kg produjeron un aumento significativo ( $p < 0.001$ ) en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos. El diazepam produce un aumento significativo ( $p < 0.001$ ) en la actividad dentro de los brazos abiertos y produce una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) en el tiempo de permanencia en los brazos cerrados, mientras que las dosis no tienen efecto sobre la actividad en los brazos cerrados.

El número de entradas a los brazos cerrados no se ve alterado puesto que no existen diferencias significativas entre grupos.

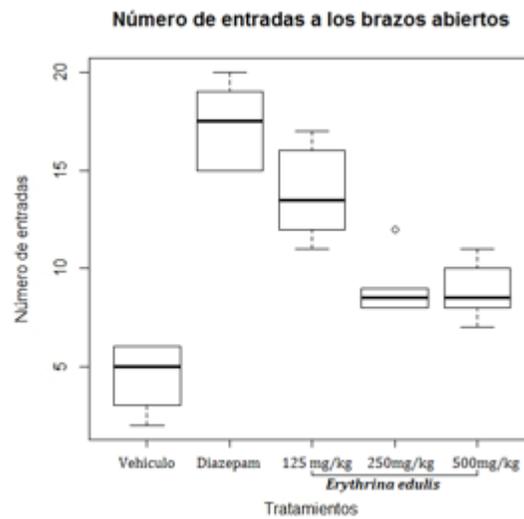
**Tabla 13:** Efecto del extracto metanólico de hojas de *Erythrina edulis* en la prueba de Laberinto en cruz elevado

Tratamiento	Dosis (mg/kg de peso)	Número de entradas a brazos abiertos	Número de entradas a brazos cerrados	Tiempo de permanencia en brazos abiertos	Tiempo de permanencia en brazos cerrados
Vehículo	1mL	4,5 ± 1,64	13 ± 0,89	75,67 ± 3,01	152,83 ± 11,69
Diazepam	0,1	17,33 ± 2,25**	10,83 ± 1,17	157,71 ± 9,7**	86,79 ± 6,14***
<i>Erythrina edulis</i>	125	13,83 ± 2,32**	12 ± 4,71	121,17 ± 10,52**	85,17 ± 10,15***
<i>Erythrina edulis</i>	250	9 ± 1,55*	11,5 ± 1,64	99,24 ± 10,17**	131,90 ± 6,68
<i>Erythrina edulis</i>	500	8,83 ± 1,47*	12,17 ± 1,47	87,53 ± 6,47	151,16 ± 15,73

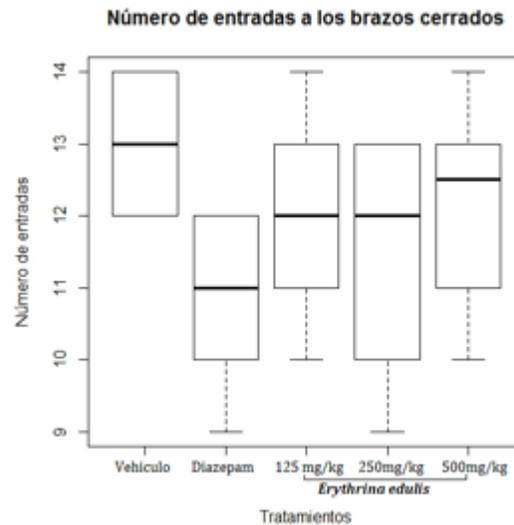
Media ± desviación estándar de 6 determinaciones. Significado de los códigos 0 ‘\*\*\*’; 0,001 ‘\*\*’; 0,01 ‘\*’; 0,05 ‘.’; 0,1 ‘.’; 1

El laberinto elevado en cruz expone a los ratones a un ambiente estresante y ansiogénico otorgado por sus brazos abiertos por lo que los ratones tienden a pasar más tiempo en los brazos protegidos. Entonces, en él se propone que el número de entradas a los brazos abiertos y el tiempo de permanencia en ellos es mayor en ratones con menor ansiedad (Walf, A. & Frye, C., 2007; Bailey, K. & Crawley, J., 2009). Como era de esperarse, el diazepam produce un aumento de entradas a los brazos abiertos de manera significativa ( $p < 0.001$ ) al ser comparado con el grupo control. De la misma forma, todas las dosis utilizadas del extracto de *E. edulis* producen un aumento en el número de entradas en los brazos abiertos y si consideramos que las dosis de 125 y 250mg/Kg producen un

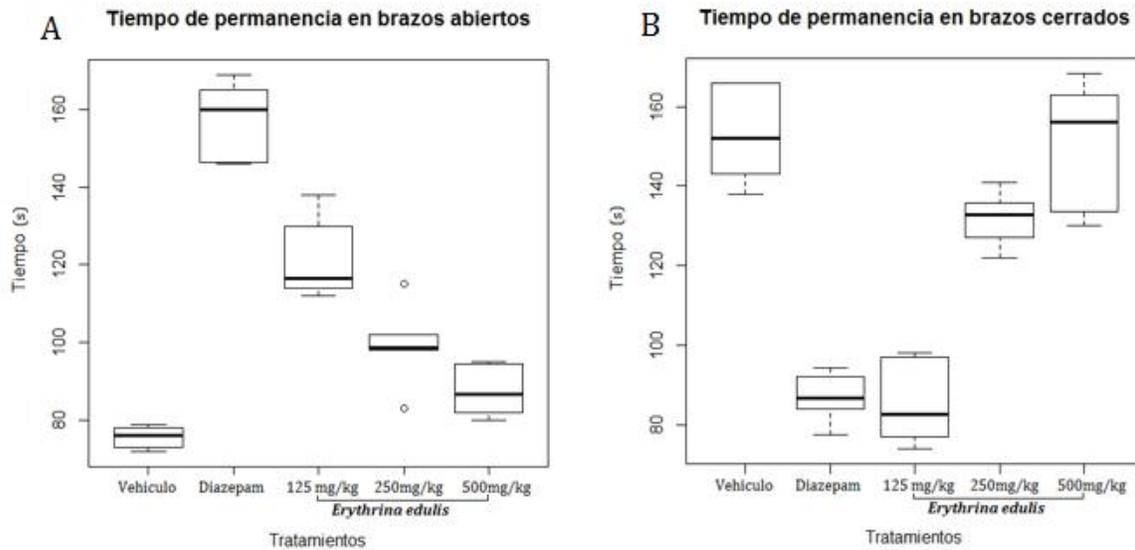
aumento en la permanencia en los brazos abiertos, nos enfrentamos a la posibilidad de que el extracto tiene un efecto ansiolítico potencial lo que refuerza los resultados obtenidos de la exposición de los ratones al campo abierto.



**Fig. 12:** Número de entradas en brazos abiertos de laberinto elevado en cruz



**Fig. 13:** Número de entradas en brazos cerrados de laberinto elevado en cruz.



**Fig. 14:** Tiempo de permanencia en brazos de laberinto elevado en cruz (A) Brazos abiertos (B) Brazos cerrados.

Al integrar los resultados de las cuatro pruebas, se asume que el extracto no produce un efecto sedante, pero se observó que altera el comportamiento de los roedores en los ensayos de ansiedad llevándonos a concluir que tiene un posible efecto ansiolítico.



## CAPITULO 4

### 4.1. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- EL extracto metanólico de las hojas de *Erythrina edulis* es no toxico lo cual permite usar de forma segura el mismo. Su CL1 corresponde a 10603,65µg/mL, CL50 de 16571,78µg/mL y CL99 de 25899,02µg/mL.
- Los grupos de compuestos presentes en el extracto metanólico de *Erythrina edulis* fueron flavonoides, antraquinonas, saponinas, taninos y mono y sesquiterpenos.
- El extracto metanólico de las hojas de *Erythrina edulis* es un extracto con potencial efecto ansiolítico no sedante, pues las pruebas de campo abierto y laberinto en cruz fueron positivas, aunque no dependientes de la dosis. Las pruebas de potenciación del sueño con pentobarbital y la de tracción fueron negativas.
- Se sugiere continuar con los estudios tanto fitoquímicos como farmacológico de dicho extracto, pues se trata de una planta nativa con efectos potenciales.



## Bibliografía

- Acero Duarte, L. (2002). *Guía para el cultivo y aprovechamiento del chachafruto o balú: Erythrina edulis Triana ex Micheli* (Segunda ed.). Bogota, Colombia: Convenio Andrés Bello.
- Ajao, M., & Akindede, A. (2013). Anxiolytic and sedative properties of hydroethanolic extract of *Telfairia occidentalis* leaves in mice. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(2), 301-309. doi:10.1590/S0102-695X2012005000138
- Álamo González, C. (2016). Enfoque terapéutico del insomnio: tratamiento farmacológico. En J. Martínez Hernández, & J. Lozano Olivares, *Pautas de actuación y seguimiento, insomnio* (págs. 58-68). Madrid : IMC.
- Anzures, M., Kassab, J., & Alvarado, R. (2010). Manifestaciones clínicas y diferenciación de los tipos de insomnio. Primera parte. *Arch Neurocién (Mex)*, 15(2), 101-111.
- Arenas, C., & Puigcerver, A. (2009). Diferencias entre hombres y mujeres en los trastornos de ansiedad: una aproximación psicobiológica. *Escritos de Psicología*, 3(1), 20-29. doi:ISSN 1989-3809
- Azparren, A., & Garcia, I. (2014). Estrategias para la deprescripción de benzodiazepinas. *BOLETÍN DE INFORMACIÓN FARMACOTERAPÉUTICA DE NAVARRA*, 22(2).
- Bailey, K., & Crawley, J. (2009). Anxiety-Related Behaviors in Mice. En J. Buccafusco, *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. Boca Ratón, Florida: CRC Press/Taylor & Francis.
- Barrera, N., & Mejía, M. (1998). *Chachafruto, balú, sachaporoto, Erythrina edulis, Triana: Pasado, presente y futuro*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia - UNAL.
- Basta, M., Chrousos, G., Vela-Bueno, A., & Vgontzas, A. (2007). Chronic Insomnia and Stress System. *Sleep Med Clin*, 2(2), 279–291.
- Cáceres, D. (7 de Diciembre de 2016). Conocimiento de medicina ancestral en la salud. *El Tiempo*.
- Cañellas Dols, F. (2016). Tratamiento no farmacológico del insomnio. En J. Martínez Hernández, & J. Lozano Olivares, *Pautas de actuación y seguimiento, insomnio* (págs. 43-56). Madrid: IMC.



- Cañigueral, S., Dellacassa, E., & Bandon, A. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? *Lat. Am. J. Pharm*, 22(3), 265-278.
- Carrillo Mora, P., Ramirez Peris, J., & Magaña Vázquez, K. (2013). Neurobiología del sueño y su importancia: antología para el estudiante universitario. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 56(4), 5-15.
- Clarkson, C., Maharaj, V., Crouch, N., Grace, O., Pillay, P., Matsabisa, M., . . . Folb, P. (2004). In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalized in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 177-191.  
doi:10.1016/j.jep.2004.02.011
- Colin, L., Burton, S., & O'Keefe, J. (2006). Rearing on Hind Legs, Environmental Novelty, and the Hippocampal Formation. *Reviews in the Neurosciences*, 17, 111-133.
- De la Peña, I., Kim, H., Botanas, C., De la Peña, J., Van Le, T., Nguyen, M., . . . Cheong, J. (2017). The psychopharmacological activities of Vietnamese ginseng in mice: characterization of its psychomotor, sedativehypnotic, antistress anxiolytic, and cognitive effects. *Journal of Ginseng Research*(9), 201 a 208.  
doi:10.1016/j.jgr.2016.03.005
- Deacon, R. (2013). Measuring Motor Coordination in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, e2609((75)). doi:10.3791/2609
- Diaz, A. (2013). Bases bioquímicas implicadas en la regulación del sueño. *Arch Neurocién (Mex)*, 18(1), 42-50.
- Diekelmann, S., & Born, J. (2010). The memory function of sleep. *Nature Reviews Neuroscience*. doi:10.1038/nrn2762
- Dominguez, V., Collares, M., Ormaechea, G., & Tamosiunas, G. (2016). Uso racional de benzodiazepinas: hacia una mejor prescripción. *Revista Uruguaya de medicina interna*(3), 14 a 24. doi:2393-6797
- Edwor Kuponiyi, T. (2013). Plant-Derived Compounds with Potential Sedative and Anxiolytic Activities. *International Journal of Basic and Applied Science*, 2(1), 63-78.



- Fernandez Teruel, A. (2008). *Farmacología de la Conducta*. Barcelona, España: Universidad Autonoma de Barcelona.
- Foyet, H., Tsala, D., Bouba, A., & Hritcu, L. (2012). Anxiolytic and Antidepressant-Like Effects of the Aqueous Extract of *Alafia multiflora* Stem Barks in Rodents. *Advances in Pharmacological Sciences*. doi:10.1155/2012/912041
- Gállego Pérez-Larraya, J., Toledo, J., Urrestarazu, E., & Iriarte, J. (2007). Clasificación de los trastornos del sueño. *An. Sist. Sanit*, 30(1), 19-36.
- Goddard, A., & Charney, D. (1997). Toward an Integrated Neurobiology of Panic Disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, 58(2), 4–11.
- Goloubkova, T., Heckler, E., Rates, S., Henriques, J., & Henriques, A. (1998). Inhibition of cytochrome P450-dependent monooxygenases by an alkaloid fraction from *Helietta apiculata* markedly potentiates the hypnotic action of pentobarbital. *Journal of Ethnopharmacology*, 60(2), 141-148. doi:10.1016/S0378-8741(97)00139-6
- Gonçalves, F. (2011). *Los trastornos del sueño*. Madrid, España: IMC
- Hamidi, M., Jovanova, B., & Panovska, T. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 60(1), 9-18.
- Hernandez, A. (2004). Fitoterapia. Bases científicas y legales para su aplicación. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 4(4), 71-74.
- Hernandez, S. (2006). El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Biomedicina*(2 (3)), 252-256. doi:ISSN: 1510-9747
- Inciarte, I., Pérez, A., Hernández, E., Sandoval, C., Ojalá-Luna, F., Márquez, M., & Páez-Rondón. (2015). Presencia del chachafruto (*Erythrina edulis* Triana ex Micheli) en el estado Mérida, Venezuela. *Revista Electrónica Conocimiento Libre y Licenciamiento (CLIC) Mérida – Venezuela*, 6(9), 140 - 153. Obtenido de <http://convite.cenditel.gob.ve/files/2015/07/RevistaCLIC09-10.pdf>
- Jhonson, M. (2016). Laboratory Mice and Rats. *Labome*, 2, 113. doi://dx.doi.org/10.13070/mm.es.2.113



- Johnston, G., Hanrahan, J., Chebib, M., Duke, R., & Mewett, K. (2006). Modulation of ionotropic GABA receptors by natural products of plant origin. *Advances in Pharmacology*, 54, 285-316.
- Khatoon, M., Khatun, H., Islam, E., & Parvin, S. (2014). Analgesic, antibacterial and central nervous system depressant activities of *Albizia procera* leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(4), 279-284.  
doi:10.12980/APJTB.4.2014C348
- Kishore, R., Anjaneyulu, M., Ganesh, M., & Sravya, N. (2012). Evaluation of anxiolytic activity of ethanolic extract of *Foeniculum vulgare* in mice model. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 584-586.
- Lagarto, A., Silva, R., Guerra, I., & Iglesias, L. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5), 395–400.
- Lamprea, M., Cárdenas, F., Setem, J. & Morato, S. (2008). Thigmotactic responses in an open-field. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41 (2). p. 135-140.
- Lea, J. (1978). *Sci. Food Agric*, 29, 471.
- Lituma, M. (14 de Septiembre de 2014). La medicina ancestral gana nuevos espacios en Ecuador. *El Comercio*.
- Lluis Berdonces, J. (2003). Historia de la Fitoterapia. *Natura Medicatrix*, 21(3), 142-152.
- López de Castro, F., Fernández Rodríguez, O., Mareque Ortega, M., & Fernández Agüero, L. (2012). Abordaje terapéutico del insomnio. *Semergen*, 38(4), 233-240.  
doi:10.1016/j.semereg.2011.11.003
- Lopez de Castro, F., Fernandez, O., Mareque, M., & Fernandez, L. (2012). Abordaje terapéutico del insomnio. *Semergen*, 38(4), 233-240.  
doi:10.1016/j.semereg.2011.11.003
- López de Castro, F., Fernández, O., Mareque, M., & Fernández, L. (2012). Abordaje terapéutico del insomnio. *Semergen*, 38(4), 233-240.  
doi:10.1016/j.semereg.2011.11.003



- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J., Moro, M., & Portoles, A. (2008).  
*Velásquez. Farmacología básica y clínica. (18º Edición ed.). Ed. Panamericana.*
- Martín Águeda, B. (2016). Diagnóstico del insomnio: historia clínica y exploraciones complementarias . En J. Martínez Hernández, & J. Lozano Olivares, *Pautas de actuación y seguimiento insomnio* (págs. 31-41). Madrid: IMC.
- Martin Arenas, F., & Pintado, C. (2014). Results of the Open Field Test at different light intensities in C57 mice. *Proceedings of Measuring Behavior* .
- Martínez Martínez, M. (2016). ¿Cuánto hay que dormir para un sueño saludable? *Revista de Neurología*(63), 7-9.
- Martino, G., & Martino, R. (2007). Manual de epilepsia. *Serie de textos Neuropediatricos*, 360-382.
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D., & McLaughlin, J. (1982). Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plants constituents. *Journal of Medicinal Plant Reasaerch*, 45, 31-34.
- Minga, D., & Verdugo, A. (2016). *Árboles y arbustos de los ríos de Cuenca Azuay-Ecuador*. Cuenca, Ecuador: Imprenta Don Bosco.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador, CONASA. (2014). *Cuadro Nacional de Medicamentos Básicos y Registro Terapeutico*. Ecuador.
- Minkel, J., & Krystal, A. (2013). Optimizing the Pharmacologic Treatment of Insomnia: Current Status and Future Horizons. *Sleep Med Clin.*, 8(3), 333–350.  
doi:10.1016/j.jsmc.2013.06.002
- Molina, G., & Said-Fernández, S. (2006). A modified microplate cytotoxicity assay with Brine Shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacologyonline*, 3, 633-638.
- Navas, W., & Vargas, M. (2012). Trastornos de Ansiedad: Revisión dirigida para atención primaria. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamerica LXIX*(604), 497-507.
- OMS. (1984). *The Promotion and Development of Traditional Medicine*. Ginebra: Ed. WHO.



- OMS. (2003). *Directrices de la OMS sobre Buenas Prácticas Agrícolas y de Recolección (BPAR) de plantas medicinales*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, Departamento de Medicamentos.
- OMS. (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*. Hong Kong, China.
- Palma, J. (2015). Protocolo diagnóstico de los trastornos. *Medicine*, 11(73), 4409-4413.
- Palma, J., Urrestarazu, E., & Iriarte, J. (2013). Sleep loss as risk factor for neurologic disorders: A review. *Sleep Medicine*(14), 229–236.  
doi:10.1016/j.sleep.2012.11.019
- Pino Pérez, O., & Jorge Lazo, F. (2010). Ensayo de Artemia: ÚTIL HERRAMIENTA DE TRABAJO PARA ECOTOXICÓLOGOS Y QUÍMICOS DE PRODUCTOS NATURALES. *Rev. Protección Veg*, 22(1), 34-43. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v25n1/rpv08110.pdf>
- Pino, S., Prieto, S., Pérez, M., & Molina, J. (2004). Género Erythrina: Fuente de Metabolitos Secundarios con Actividad Biológica. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23(2), 252-8.
- Rejon, J., Placer, D., & Roldán, G. (2011). Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas. *Universitas Medica*, 52(1), 78-89.
- Reyes, J. (s.f.). *Trastornos de ansiedad guía práctica para diagnóstico y tratamiento*. Recuperado el 04 de Octubre de 2017, de Biblioteca Virtual de Salud de Honduras: <http://www.bvs.hn/Honduras/pdf/TrastornoAnsiedad.pdf>
- Rios, M., Koziol, M. J., Borgtoft Pedersen, H., & Granda, G. (2007). *Plantas Útiles del Ecuador: Aplicaciones, Retos y Perspectivas/Useful plants of Ecuador: Applications, challenges, and perspectives*. Quito, Ecuador: Corporación Sociedad para la Investigación y Monitoreo de la Biodiversidad Ecuatoriana (SIMBIOE).
- Rosas Gutiérrez, I., Simón Arceo, K., & Mercado, F. (2013). Mecanismo celular y molecular de la adicción a benzodiacepinas. *Salud Mental*, 36(4), 325-329.  
doi:http://132.247.16.20/pdf/sm3604/sm3604325.pdf



- Salomons, A., Pinzon, N., Boleij, H., Kirchhoff, S., Arndt, S., Nordquist, R., . . . Ohl, F. (2012). Differential effects of diazepam and MPEP on habituation and neuro-behavioural processes in inbred mice. *Behavioral and Brain Functions*, 8:30. doi:10.1186/1744-9081-8-30
- Sánchez, A., Navarro, C., Nellen, H., & Halabe, J. (2016). Insomnio. Un grave problema de salud pública. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 54(6), 760-769. Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2016/im166k.pdf>
- Sanchez, B. (1962). *Tranquilizantes en Medicina*. España: Real Academia Nac. Medicina.
- Santiago, V., Valencia, M., Reséndiz, M., Castaño, A., Cantú, C., & García, G. (2014). *Día mundial del sueño*. Recuperado el 7 de Agosto de 2017, de Instituto Nacional de ciencias Médicas y nutrición Salvador Zubirán, Mexico: <http://www.innsz.mx/descargas/cursos/DiaMundialSueno2014.pdf>
- Santos, N., Viana, G., Cunha, W., Campos, A., & Da Costa, J. (2015). The essential oil from *Vanillosmopsis arborea* Baker (Asteraceae) presents antinociceptive, anti-inflammatory, and sedative effects. *International Journal of Green Pharmacy*(9), 138-142. doi:223.30.225.254]
- Seibenhener, M., & Wooten, M. (2015). Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. . *Journal of Visualized Experiments*, 96. doi:10.3791/52434
- Sheik, H., Vedhaiyan, N., & Singaravel, S. (2014). Evaluation of *Abelmoschus moschatus* seed extract in psychiatric and neurological disorders. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 3((5)), 845-853. doi: 10.5455/2319-2003.ijbcp20141022
- Steimer, T. (2002). The biology of fear- and anxiety-related behaviors. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 4(3), 231-249.
- University of Jerusalem. (2002). *ICR (CD1)*. Recuperado el 21 de agosto de 2017, de Harlan Europe: <https://animals.ekmd.huji.ac.il/He/home/animalOrder/Documents/ICR.pdf>
- Urrestarazu, E., Escobar, F., & Iriarte, J. (2015). El sueño y su patología. *Medicine*, 4385-4394. doi:10.1016/j.med.2015.02.004



- Vassalli, A., & Dijk, D. (2009). Sleep function: current questions and new approaches. *European Journal of Neuroscience*, 29, 1830–1841. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06767.x
- Vindel, C. (2011). Bases teóricas y apoyo empírico de la intervención psicológica sobre los desórdenes emocionales en atención primaria. Una actualización. *Ansiedad y estrés*, 17(2-3), 157-184.
- Viniegra, M., Parellada, N., de Moraes Ribeiro, R., Parellada, L., Planas, C., & Momblan, C. (2014). Abordaje integrativo del insomnio en atención primaria: medidas no farmacológicas y fitoterapia frente al tratamiento convencional. *Atención Primaria*. doi:10.1016/j.aprim.2014.07.009
- Vogel, H., & Vogel, W. (Edits.). (2013). *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays* (illustrated ed.). Berlin, Alemania: Springer Science & Business Media. doi:10.1007/978-3-662-03333-3
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*. Alemania: Springer.
- Walf, A., & Frye, C. (2007). The use of the elevated plus maze as an essay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322–328. doi:10.1038/nprot.2007.44.

**ANEXOS**

**Anexo 1. *Erythrina edulis* Triana ex Micheli**



**Fig. 15:** Árbol de *Erythrina edulis* localizado en el cantón Chordeleg de la Provincia del Azuay



**Fig. 16:** Flor de *Erythrina edulis*

**Anexo 2. Caracterización Botánica de la planta medicinal *Erythrina edulis* Triana ex Michelli realizada en el Herbario de la Universidad del Azuay**



**Anexo 3. Ficha de *Erythrina edulis* que se puede encontrar en el repositorio digital del Herbario de la Universidad del Azuay bajo el número 11980**



**Anexo 4. Procesamiento del material vegetal para la obtención del extracto**



**Fig. 17:** Selección de hojas de *E. edulis*



**Fig. 18:** Lavado de las hojas de *E. edulis*



**Fig. 19:** Reposo de las hojas de *E. edulis* en agua destilada



**Fig. 20:** Escurrido de hojas de *E. edulis* en bandejas metálicas



**Fig. 21:** Trituración de las hojas de *E. edulis*



**Fig. 22:** Triturado de las hojas de *E. edulis*



**Fig. 23:** Pesaje de droga seca



**Fig. 24:** Ensamblaje de percolador



**Fig. 25:** Percoladores armados previo reposo por 24 horas



**Fig. 26:** Proceso de percolación de la droga



**Fig. 27:** Concentración del extracto fluido en Rotavapor Heidolph Laborota 4000 Efficient HB digital



**Fig. 28:** Sonicación de extracto concentrado.



**Fig. 29:** Eliminación del solvente mediante nitrógeno en el baño ultrasónico



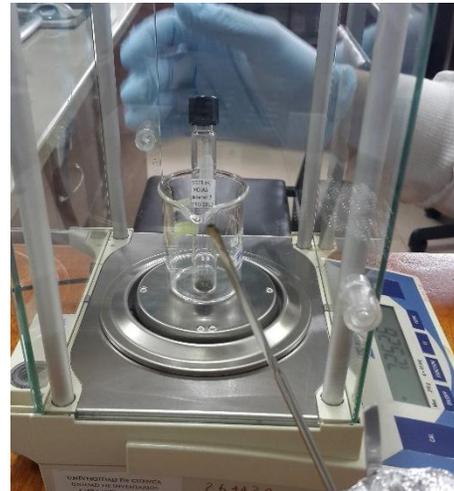
**Fig. 30:** Congelamiento de extracto previo a Liofilización



**Fig. 31:** Ensamblaje de Liofilizador Labconco Free zone 2.5



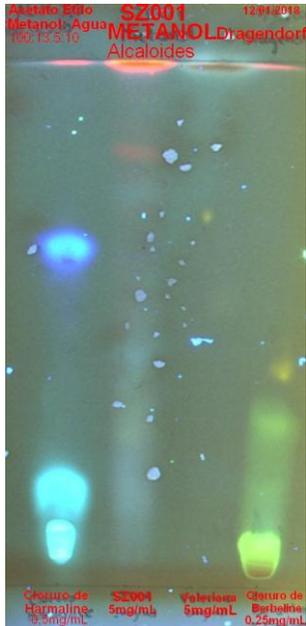
**Fig. 32:** Extracto metanólico seco obtenido por liofilización

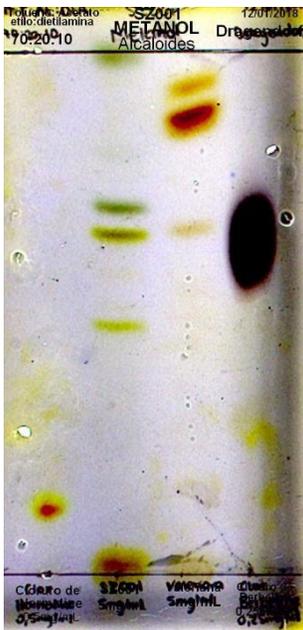


**Fig. 33:** Dosificación de extracto en tubos de vidrio

**Anexo 5. Imágenes de TLC de extracto metanólico de hojas de *Erythrina edulis***

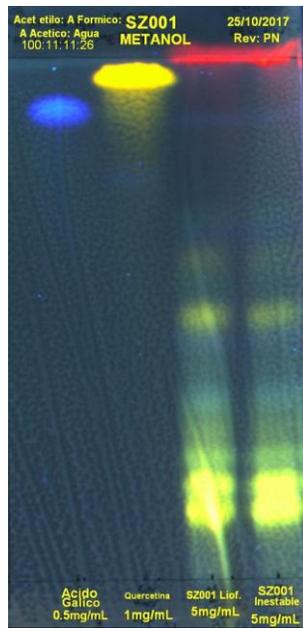
**Tabla 14:** Cromatogramas de Alcaloides en TLC del extracto metanólico de hojas de *Erythrina edulis*

FASE MOVIL	REVELADO R	TIPO DE VISUALIZACION	
		LUZ VISIBLE	LUZ UV 366nm
Acetato de etilo: Metanol: Agua (100:13,5:10)	Dragendorf		

<p>Acetato de etilo: Metanol: Agua (100:13,5:10)</p>	<p>Ninhidrina</p>		
<p>Tolueno: Acetato de etilo: Dietilamina (70:20:10)</p>	<p>Dragendorf</p>		
<p>Tolueno:</p>	<p>Ninhidrina</p>		



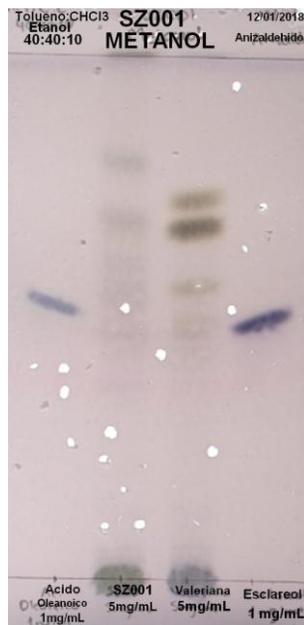
<p>Acetato de etilo: Dietilamina (70:20:10)</p>			
<p>Tolueno: Acetato de etilo: Dietilamina (70:20:10)</p>	<p>0,5% de yodo en Cloroformo</p>		



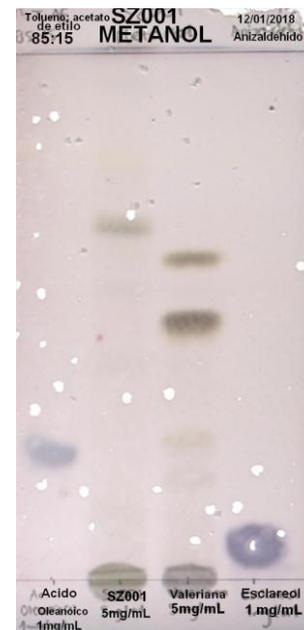
**Fig. 34:** Visualización de Flavonoides con revelador de Productos naturales en una longitud de onda de 366nm



**Fig. 35:** Visualización de Antraquinonas con revelador de Productos naturales en una longitud de onda de 366nm



**Fig. 36:** Visualización de Terpenos con revelador de Anizaldehido y fase móvil de Tolueno: Cloroformo: Etanol (40:40:10) en luz visible



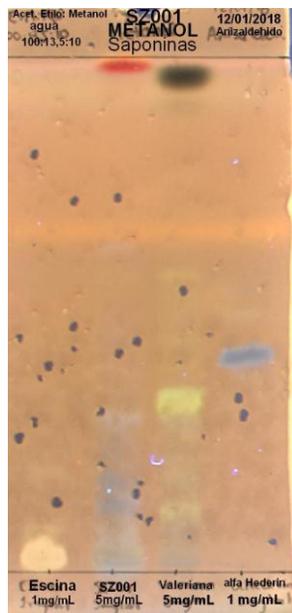
**Fig. 37:** Visualización de Terpenos con revelador de Anizaldehido y fase móvil de Tolueno: Acetato de Etilo (85:15) en luz visible



**Fig. 38:** Visualización de Saponinas con revelador de Anizaldehido y fase móvil de Cloroformo: Ácido acético: Metanol: Agua (64:32:12:8) a 366nm



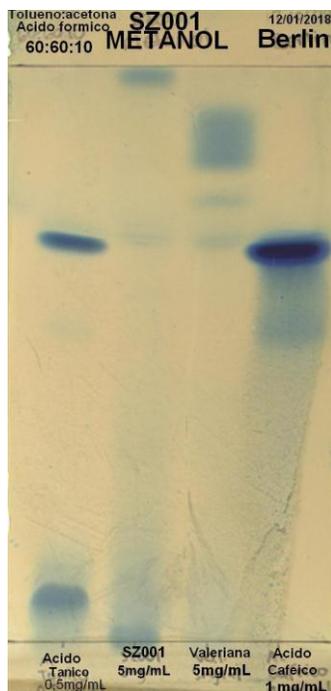
**Fig. 39:** Visualización de Saponinas con revelador de Anizaldehido y fase móvil de Cloroformo: Ácido acético: Metanol: Agua (64:32:12:8) en luz visible



**Fig. 40:** Visualización de Saponinas con revelador de Anizaldehido y fase móvil de Cloroformo: Ácido acético: Metanol: Agua (64:32:12:8) en luz visible



**Fig. 41:** Visualización de Saponinas con revelador de Anizaldehido y fase móvil de Cloroformo: Ácido acético: Metanol: Agua (64:32:12:8) en luz visible



**Fig. 42:** Visualización de Taninos con revelador Berlín y fase móvil de Tolueno: Acetona: Ácido Fórmico (60: 60:10) en luz visible

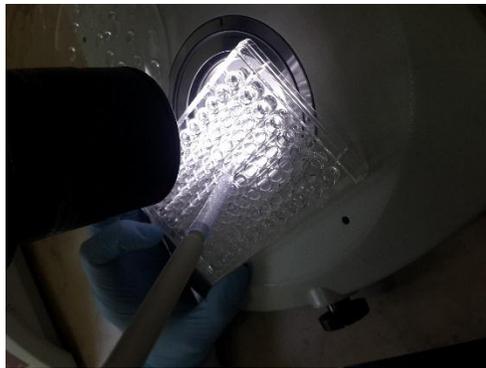
**Anexo 6. Toxicidad con Artemia Salina**



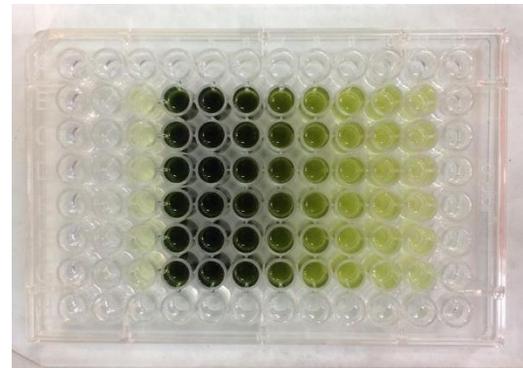
**Fig. 43:** Eclosión de los quistes de Artemia Salina



**Fig. 44:** Recolección de nauplios



**Fig. 45:** Distribución de nauplios en los pocillos



**Fig. 46:** Placa con diluciones del extracto



## Anexo 7. Pruebas estadísticas aplicadas en los ensayos farmacológicos *in vivo*

### A. TOXICIDAD EN ARTEMIA SALINA

**Tabla 15:** Test ANOVA para concentración letal 50 del extracto metanólico de hojas *Erythrina edulis* en Artemia salina

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	PR(>F)
<b>Concentración</b>	1	5,874462816	5,874462816	32,5240469	0,010692182*
<b>Residuales</b>	3	0,541857184	0,180619061		

Significado de los códigos 0 '\*\*\*'; 0,001 '\*\*'; 0,01 '\*'; 0,05 '.'; 0,1 '.'; 1

### B. PRUEBA DE POTENCIACIÓN DEL SUEÑO CON PENTOBARBITAL SÓDICO

**Tabla 16:** Test ANOVA para tiempo de latencia en la prueba de inducción del sueño con Pentobarbital sódico

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	PR(>F)
<b>Concentración</b>	5	7,09	1,4179	5,661	0,00105**
<b>Residuales</b>	28	7,07	0,2525		

Significado de los códigos 0 '\*\*\*'; 0,001 '\*\*'; 0,01 '\*'; 0,05 '.'; 0,1 '.'; 1

**Tabla 17:** Test ANOVA para tiempo de sueño en la prueba de inducción del sueño con Pentobarbital sódico

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	PR(>F)
<b>Concentración</b>	5	2931,0	586,7	37,1	1,69 e <sup>-11</sup> ***
<b>Residuales</b>	28	443,6	15,8		

Significado de los códigos 0 '\*\*\*'; 0,001 '\*\*'; 0,01 '\*'; 0,05 '.'; 0,1 '.'; 1

**Tabla 18:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de tiempo de latencia en la prueba de inducción del sueño con Pentobarbital sódico

Grupo	Grupo	Significancia
<b>Control negativo</b>	Diazepam	0,0004607 ***
	125	0,8846798
	250	0,3261729
	500	0,0539342 .
	1000	0,0843281
<b>Diazepam</b>	125	0,0117196 *
	250	0,0658955
	500	0,3504412
	1000	0,2565649
<b>125 mg/kg SZ001</b>	250	0,9428494
	500	0,4818750
	1000	0,6035853
<b>250 mg/kg SZ001</b>	500	0,9318566

	1000	0,9757019
<b>500 mg/kg SZ001</b>	1000	0,9999414

**Tabla 19:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de tiempo de sueño en la prueba de inducción del sueño con Pentobarbital sódico

Grupo	Grupo	Significancia
<b>Control negative</b>	Diazepam	0,0000002 ***
	125	0,9982046
	250	0,0080652 *
	500	0,0160299 .
	1000	0,0674195
<b>Diazepam</b>	125	0,0000002 ***
	250	0,0000000 ***
	500	0,0000000 ***
	1000	0,0002544 ***
<b>125 mg/kg SZ001</b>	250	0,0341277
	500	0,0618563
	1000	0,0359510
<b>250 mg/kg SZ001</b>	500	0,9997529
	1000	0,0000036 ***
<b>500 mg/kg SZ001</b>	1000	0,0000074 ***

### C. PRUEBA DE TRACCION

**Tabla 20:** Test ANOVA para tiempo de restablecimiento a los 30 minutos en la prueba de tracción

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	PR(>F)
<b>Concentración</b>	4	3637	909,1	6475	<2e <sup>-16***</sup>
<b>Residuales</b>	25	4	0,1		

Significado de los códigos 0 '\*\*\*'; 0,001 '\*\*'; 0,01 '\*'; 0,05 '.'; 0,1 '.'; 1

**Tabla 21:** Test ANOVA para tiempo de restablecimiento a los 60 minutos en la prueba de tracción

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	PR(>F)
<b>Concentración</b>	4	3395	848,8	1143	<2e <sup>-16***</sup>
<b>Residuales</b>	25	19	0,7		

Significado de los códigos 0 '\*\*\*'; 0,001 '\*\*'; 0,01 '\*'; 0,05 '.'; 0,1 '.'; 1

**Tabla 22:** Test ANOVA para tiempo de restablecimiento a los 90 minutos en la prueba de tracción

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	PR(>F)
<b>Concentración</b>	4	3798	947,1	17774	$<2e^{-16}$ ***
<b>Residuales</b>	25	1	0,1		

Significado de los códigos 0 '\*\*\*'; 0,001 '\*\*'; 0,01 '\*'; 0,05 '.'; 0,1 '.'; 1

**Tabla 23:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de tiempo de restablecimiento a los 30 minutos en la prueba de tracción

Grupo	Grupo	Significancia
<b>Control negativo</b>	Diazepam	0,000000 ***
	125	0,0035554 *
	250	0,1698229 *
	500	0,9928354
<b>Diazepam</b>	125	0,000000 ***
	250	0,000000 ***
	500	0,000000 ***
	250	0,4328245
<b>125mg/kg SZ001</b>	500	0,0012293
<b>250 mg/kg SZ001</b>	500	0,742840

**Tabla 24:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de tiempo de restablecimiento a los 60 minutos en la prueba de tracción

Grupo	Grupo	Significancia
<b>Control negativo</b>	Diazepam	0,000000 ***
	125	0,1343782
	250	0,0020428 .
	500	0,0060204
<b>Diazepam</b>	125	0,000000 ***
	250	0,000000 ***
	500	0,000000 ***
	250	0,3798938
<b>125mg/kg SZ001</b>	500	0,6370749
<b>250 mg/kg SZ001</b>	500	0,9920427



**Tabla 25:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de tiempo de restablecimiento a los 60 minutos en la prueba de tracción

Grupo	Grupo	Significancia
Control negativo	Diazepam	0,000000 ***
	125	0,1343782
	250	0,0020428 .
	500	0,0060204
Diazepam	125	0,000000 ***
	250	0,000000 ***
	500	0,000000 ***
125mg/kg SZ001	250	0,3798938
	500	0,6370749
250 mg/kg SZ001	500	0,9920427

**Tabla 26:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de tiempo de restablecimiento a los 90 minutos en la prueba de tracción

Grupo	Grupo	Significancia
Control negativo	Diazepam	0,000000 ***
	125	0,4956454
	250	0,9545016
	500	0,6481669
Diazepam	125	0,000000 ***
	250	0,000000 ***
	500	0,000000 ***
125mg/kg SZ001	250	0,8843515
	500	0,9990743
250 mg/kg SZ001	500	0,9599653

#### D. CAMPO ABIERTO

**Tabla 27:** Test ANOVA para número de líneas cruzadas en la prueba de campo abierto

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	PR(>F)
<b>Concentración</b>	4	25710	6428	70,5	3,03e <sup>-13</sup> ***
<b>Residuales</b>	25	2279	91		

Significado de los códigos 0 '\*\*\*'; 0,001 '\*\*'; 0,01 '\*'; 0,05 '.'; 0,1 '.'; 1

**Tabla 28:** Test ANOVA para número de entradas al cuadrante central en la prueba de campo abierto

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	PR(>F)
<b>Concentración</b>	4	157,9	39,47	11,28	2,28 e <sup>-5</sup> ***
<b>Residuales</b>	25	87,5	3,5		

Significado de los códigos 0 '\*\*\*'; 0,001 '\*\*'; 0,01 '\*'; 0,05 '.'; 0,1 '.'; 1



**Tabla 29:** Test ANOVA para tiempo de permanencia en cuadrante interno en la prueba de campo abierto

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	PR(>F)
<b>Concentración</b>	4	1203	300,8	2,764	0,0497 *
<b>Residuales</b>	25	2721	108,8		

Significado de los códigos 0 '\*\*\*'; 0,001 '\*\*'; 0,01 '\*'; 0,05 '.'; 0,1 '.'; 1

**Tabla 30:** Test ANOVA para rearing asistido en la prueba de campo abierto

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	PR(>F)
<b>Concentración</b>	4	3766	941,5	34,53	7,61 e <sup>-10</sup> ***
<b>Residuales</b>	25	682	27,3		

Significado de los códigos 0 '\*\*\*'; 0,001 '\*\*'; 0,01 '\*'; 0,05 '.'; 0,1 '.'; 1

**Tabla 31:** Test ANOVA para rearing no asistido en la prueba de campo abierto

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	PR(>F)
<b>Concentración</b>	4	186,9	46,72	4,846	0,00494**
<b>Residuales</b>	25	241,0	9,64		

Significado de los códigos 0 '\*\*\*'; 0,001 '\*\*'; 0,01 '\*'; 0,05 '.'; 0,1 '.'; 1

**Tabla 32:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de número de líneas cruzadas en la prueba de campo abierto

Grupo	Grupo	Significancia
<b>Control negativo</b>	Diazepam	0,0000504 ***
	125	0,0021426
	250	0,3112693
	500	0,0000000
<b>Diazepam</b>	125	0,0000000
	250	0,0000004
	500	0,0000000
<b>125mg/kg SZ001</b>	250	0,1788933
	500	0,0000151
<b>250 mg/kg SZ001</b>	500	0,0000001



**Tabla 33:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de número de entradas al cuadrante central en la prueba de campo abierto

Grupo	Grupo	Significancia
<b>Control negativo</b>	Diazepam	0,1302762
	125	0,0003889
	250	0,0000813
	500	0,0001776
<b>Diazepam</b>	125	0,1302762
	250	0,0360148
	500	0,0702018
<b>125mg/kg SZ001</b>	250	0,9709645
	500	0,9978915
<b>250 mg/kg SZ001</b>	500	0,9978915

**Tabla 34:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de tiempo de permanencia en cuadrante interno en la prueba de campo abierto

Grupo	Grupo	Significancia
<b>Control negativo</b>	Diazepam	0,2074501
	125	0,2074501
	250	0,0308804
	500	0,1704847
<b>Diazepam</b>	125	1,0000000
	250	0,8781536
	500	0,9999635
<b>125mg/kg SZ001</b>	250	0,8781536
	500	0,9999635
<b>250 mg/kg SZ001</b>	500	0,9186945

**Tabla 35:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de rearing asistido en la prueba de campo abierto

Grupo	Grupo	Significancia
<b>Control negativo</b>	Diazepam	0,0000000
	125	0,0009431
	250	0,0004065
	500	0,0012473
<b>Diazepam</b>	125	0,0000022
	250	0,0000049
	500	0,0000017
<b>125</b>	250	0,9972081
	500	0,9999637
<b>250</b>	500	0,9915681

**Tabla 36:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de rearing no asistido en la prueba de campo abierto

Grupo	Grupo	Significancia
<b>Control negativo</b>	Diazepam	0,0082098
	125	0,9898174
	250	0,5227805
	500	0,9999818
<b>Diazepam</b>	125	0,0246220
	250	0,2358354
	500	0,0102734
<b>125mg/kg SZ001</b>	250	0,7967928
	500	0,9956539
<b>250 mg/kg SZ001</b>	500	0,5795522

### E. LABERINTO ELEVADO EN CRUZ

**Tabla 37:** Test ANOVA para número de entradas a brazos abiertos en la prueba de Laberinto en cruz elevado

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	PR(>F)
<b>Concentración</b>	4	591,8	147,95	41,79	1,01e <sup>-10***</sup>
<b>Residuales</b>	25	88,5	3,54		

Significado de los códigos 0<sup>\*\*\*</sup>; 0,001<sup>\*\*</sup>; 0,01<sup>\*</sup>; 0,05<sup>.</sup>; 0,1<sup>'</sup>; 1

**Tabla 38**

**Tabla 39:** Test ANOVA para número de entradas a brazos cerrados en la prueba de Laberinto en cruz elevado

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	PR(>F)
<b>Concentración</b>	4	15,53	3,883	2,149	0,104
<b>Residuales</b>	25	45,17	1,807		

Significado de los códigos 0<sup>\*\*\*</sup>; 0,001<sup>\*\*</sup>; 0,01<sup>\*</sup>; 0,05<sup>.</sup>; 0,1<sup>'</sup>; 1

**Tabla 40:** Test ANOVA para tiempo de permanencia en brazos abiertos en la prueba de Laberinto en cruz elevado

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	PR(>F)
<b>Concentración</b>	4	25110	62,77	87,4	2,56e <sup>-14***</sup>
<b>Residuales</b>	25	1796	72		

Significado de los códigos 0<sup>\*\*\*</sup>; 0,001<sup>\*\*</sup>; 0,01<sup>\*</sup>; 0,05<sup>.</sup>; 0,1<sup>'</sup>; 1



**Tabla 41:** Test ANOVA para tiempo de permanencia en brazos cerrados en la prueba de Laberinto en cruz elevado

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	PR(>F)
<b>Concentración</b>	4	26964	6741	59,2	2,18e <sup>-12***</sup>
<b>Residuales</b>	25	2846	114		

Significado de los códigos 0<sup>\*\*\*</sup>; 0,001<sup>\*\*</sup>; 0,01<sup>\*</sup>; 0,05<sup>.</sup>; 0,1<sup>'</sup>; 1

**Tabla 42:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de número de entradas en brazos abiertos en la prueba de laberinto elevado en cruz

Grupo	Grupo	Significancia
<b>Control negativo</b>	Diazepam	0,000000***
	125	0,0000001**
	250	0,0028950*
	500	0,0042374*
<b>Diazepam</b>	125	0,0265008 .
	250	0,0000005**
	500	0,0000003**
<b>125mg/kg SZ001</b>	250	0,0013403*
	500	0,0009095**
<b>250 mg/kg SZ001</b>	500	0,9998661

**Tabla 43:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de número de entradas en brazos cerrados en la prueba de laberinto elevado en cruz

Grupo	Grupo	Significancia
<b>Control negativo</b>	Diazepam	0,0680990
	125	0,7003542
	250	0,3268556
	500	0,8180094
<b>Diazepam</b>	125	0,5698781
	250	0,9089885
	500	0,4415211
<b>125mg/kg SZ001</b>	250	0,9661222
	500	0,9994922
<b>250 mg/kg SZ001</b>	500	0,9089885

**Tabla 44:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de tiempo de permanencia en brazos abiertos en la prueba de laberinto elevado en cruz

Grupo	Grupo	Significancia
<b>Control negativo</b>	Diazepam	0,0000000***
	125	0,0000000***
	250	0,0176575 .
	500	0,9987050
<b>Diazepam</b>	125	0,9988545



	250	0,0000011**
	500	0,0000000***
<b>125mg/kg SZ001</b>	250	0,0000006**
	500	0,0000000***
<b>250 mg/kg SZ001</b>	500	0,0329916

**Tabla 45:** Test post-hoc HSD Tukey de comparaciones múltiples de tiempo de permanencia en brazos cerrados en la prueba de laberinto elevado en cruz

<b>Grupo</b>	<b>Grupo</b>	<b>Significancia</b>
<b>Control negativo</b>	Diazepam	0,0000000***
	125	0,0000000***
	250	0,0005279**
	500	0,1416157
<b>Diazepam</b>	125	0,0000008**
	250	0,0000000***
	500	0,0000000***
<b>125mg/kg SZ001</b>	250	0,0012362*
	500	0,0000031**
<b>250 mg/kg SZ001</b>	500	0,1504557

**Anexo 8. Ensayos con Ratones Swiss CD1**



**Fig. 47:** Acondicionamiento de los ratones en jaulas



**Fig. 48:** Inyección intraperitoneal del extracto



**Fig. 49:** Prueba de Tracción



**Fig. 50:** Prueba de Campo Abierto



**Fig. 51:** Laberinto elevado en cruz