



Tamizaje fitoquímico y evaluación de la actividad sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico de *Eugenia clarensis* Britton & P. Wilson

[Phytochemical screening and evaluation of the central nervous system activity of the ethanolic extract of *Eugenia clarensis* Britton & P. Wilson]

Nghia TM. Nguyen^{1*}, Liliana Vicet-Muro¹, Dany Siverio-Mota¹, Maria E. Jorge-Rodriguez¹, Dulce M. González-Mosquera¹, Idelfonso Castañeda-Noa²

¹Departamento de Farmacia. Facultad de Química y Farmacia; ²Centro de Estudios del Jardín Botánico. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas, Carretera de Camajuaní Km. 5.5. Santa Clara, Cuba.

*E-mail: nnguyenthiminh278@gmail.com; nnguyenthiminh@uclv.edu.cu

Abstract

Context: *Eugenia clarensis* Britton & P. Wilson is an endangered plant endemic of central region of Cuba.

Aims: To perform phytochemical profile of ethanolic leaf extract of *E. clarensis* and evaluate its central nervous system (CNS) activity.

Methods: The dried powder of leaves of *E. clarensis* was exhaustively extracted with ethanol by maceration. This extract underwent preliminary phytochemical analysis and these results were corroborated by the thin layer chromatographic technique. CNS effects were investigated in NMRI mice at doses 200, 400 and 800 mg/kg using Irwin test, curiosity tests and traction.

Results: Phytochemical screening suggested the presence of phenols, tannins, triterpenoids, sterols, flavonoids, coumarins, quinones, resins and reducing sugar. The oral administration of this extract, in Irwin test, produced slight reduction in spontaneous motor activity and muscle tone in mice at doses of 400 and 800 mg/kg, moreover, it exhibited diuretic activity. In addition this extract at dose 800 mg/kg decreased number of times which mice introduced its head into holes in comparison with the negative control. In the traction test, the mice treated with the extract showed a non-significant failure in traction at all doses tested.

Conclusions: These findings indicate that the extract in higher doses has exerts a weak sedative and non-effect about the motor coordination. The results obtained in the preliminary phytochemical testing thus suggest that the ethanolic leaf extract of *E. clarensis* contains some metabolites, which may be responsible of sedative action.

Keywords: *Eugenia clarensis*; neuroeffects; phytochemical screening.

Resumen

Contexto: *Eugenia clarensis* Britton & P. Wilson es una planta endémica de la región central de Cuba.

Objetivos: Obtener el perfil fitoquímico del extracto etanólico de *E. clarensis* y evaluar su efecto sobre el sistema nervioso central (SNC).

Métodos: El polvo seco de hojas de *E. clarensis* se maceró exhaustivamente con etanol absoluto. El extracto se sometió a un análisis fitoquímico preliminar y los resultados se corroboraron usando cromatografía en capa delgada (CCD). La actividad sobre el SNC se evaluó a las dosis de 200, 400 y 800 mg/kg en ratones de la línea NMRI a través del test de Irwin, test de la curiosidad y test de la tracción.

Resultados: Se encontraron evidencias de fenoles, taninos, triterpenos, esteroides, quinonas, flavonoides, coumarinas, resinas y azúcares reductores. La administración oral del extracto, en el test de Irwin, produjo una disminución leve en actividad locomotora espontánea y tono muscular a dosis 400 y 800 mg/kg observándose también cierta actividad diurética. Por otro lado el extracto a dosis 800 mg/kg redujo de manera significativa el número de veces que el ratón introduce la cabeza en los agujeros en comparación con el grupo control negativo. En test de la tracción, los ratones tratados con el extracto manifestaron una tracción normal a las dosis ensayadas.

Conclusiones: Los resultados indican que el extracto a dosis altas mostró un ligero efecto sedante sobre el SNC sin afectar la coordinación motora. El estudio fitoquímico preliminar reveló la presencia de metabolitos que pudieran ser responsable a la acción sedante.

Palabras Clave: *Eugenia clarensis*; neuroefectos; tamizaje fitoquímico.

ARTICLE INFO

Received | Recibido: November 26, 2015.

Received in revised form | Recibido en forma corregida: January 12, 2016.

Accepted | Aceptado: January 17, 2016.

Available Online | Publicado en Línea: January 20, 2016.

Declaration of interests | Declaración de Intereses: The authors declare no conflict of interest.

Funding | Financiación: The authors confirm that the project has not funding or grants.

Academic Editor | Editor Académico: Gabino Garrido.



INTRODUCCIÓN

El uso de medicamentos tradicionales a nivel mundial se ha incrementado considerablemente en las dos últimas décadas. Aun así el número de especies y productos que han sido estudiados con fines médicos es bajo, menor aún son los especies que cuentan con estudios de seguridad, eficacia y calidad (WHO, 2003; Frass et al., 2012). En este sentido, la familia *Myrtaceae*, una de las familias con mayor número de especies medicinales distribuidas en América (Benfatti et al., 2010) no es ajena a esta situación. Posee cerca de 100 géneros y más de 3000 especies, algunas de los cuales poseen efectos farmacológicos importantes como antimicrobiano, anticolinesterasa, antidepresivo, antioxidante, antiinflamatorio y analgésico, entre otros (Jorge et al., 2010; Mahakittikun et al., 2013). Estos efectos están relacionados en buena medida con la presencia de los metabolitos secundarios como aceites esenciales, fla-

vonoides y taninos, entre otros. (Valle, 2008; Benfatti et al., 2010, Torres Cubiña, 2012).

En Cuba se ha identificado la especie *Eugenia clarensis* Britton & P. Wilson (Fig. 1), la cual es endémica de la región central del país, específicamente en la provincia de Villa Clara (Alturas de Cubanacán) (Córdova-Acosta et al., 2012). Esta especie, al igual que otras endémicas, se encuentra en serio peligro de extinción debido a la reducción de sus hábitats naturales y al desconocimiento desde el punto de vista fitoquímico y farmacológico que en alguna medida posibilita una utilización por parte de la población y con ello la propagación de la especie. El objetivo fundamental de esta investigación es detectar la posible presencia de grupos de metabolitos secundarios mediante análisis fitoquímico preliminar y evaluar los efectos sobre el SNC del extracto etanólico de las hojas de *E. clarensis*.

A**B**

Figura 1. Especie *Eugenia clarensis* Britton & P.Wilson. (A) planta y (B) rama.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Departamento de Farmacia de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV), en el período comprendido desde febrero hasta junio de 2015.

Obtención del material vegetal

La recolección del material vegetal se realizó en horas tempranas de la mañana, en el Jardín Botánico de la UCLV, en el mes de febrero de 2015; las partes aéreas se trasladaron en bolsas de nylon hasta el laboratorio de Farmacognosia y Química Farmacéutica donde se lavaron con abundante agua potable y se procedió a la selección de las hojas como material de interés. Previo al procesamiento del material, se realizó la comprobación botánica de la especie por el Dr. C. Idelfonso Castañeda Noa, especialista en Taxonomía Vegetal del citado centro de estudios. Ejemplares de la planta se compararon con muestras identificadas en el herbario localizado en el Jardín Botánico de la citada institución, bajo el número 8015.

Preparación del extracto

El material vegetal (hojas) se secó en estufa a 30°C hasta peso constante y posteriormente pulverizado en molino de cuchillas (IKA, Chisty & Norris, Alemania). De la muestra vegetal seca y molinada, se pesaron 20 g y se maceraron con 200 mL de etanol absoluto en agitación continua durante 24 horas, realizándose separadamente dos extracciones bajo las mismas condiciones. Los extractos se combinaron y se eliminó la clorofila por tratamiento con carbón activado 1% (Floate et al., 1997). Posteriormente, el extracto se filtró y se llevó a sequedad bajo presión reducida en un evaporador rotatorio (BÜCHI R-200, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland).

Tamizaje fitoquímico

La identificación cualitativa de los metabolitos presentes en el extracto etanólico de *E. clarensis* se realizó utilizando la técnica del tamizaje fitoquímico descrita por (Miranda y Cuellar, 2012). El extracto se evaluó en CCD empleando placas de ílica Gel 60 F254 (fase estacionaria) y la fase móvil n-hexano:

acetato de etilo (7:3). Los cromatogramas se examinaron bajo luz UV a 254 nm y a 366 nm previo al revelado con ácido sulfúrico 20% en metanol, tricloruro de aluminio 1% en etanol visualizado a 365 nm para flavonoides, vainillina para fenoles y/o esteroides y terpenos, vapores de amoníaco para flavonoides y quinonas (Lock de Ugaz, 1994; European Pharmacopoeia, 2013).

Evaluación *in vivo* de la actividad sobre el sistema nervioso central

El efecto sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico de *E. clarensis* se evaluó mediante el Test de Irwin, Test de la curiosidad y Test de tracción en ratones NMRI machos con peso de 20 ± 2 g provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorios (CENPALAB), La Habana, Cuba.

Test de Irwin (Irwin, 1968)

Se establecieron seis grupos experimentales: un grupo control negativo (cloruro de sodio 0,9% (UNI-CHEM®) 10 mL/kg), dos grupos de controles positivos (caféina 16 mg/kg y clopromazina 8 mg/kg, ambos suministrados por QUIMEFA, Cuba) y tres grupos tratados (extracto etanólico de *E. clarensis* a dosis de 200, 400 y 800 mg/kg).

Los signos y síntomas analizados fueron: la presencia o ausencia de letalidad, convulsiones, cola de Straub, sedación, excitación, marcha anormal (rodar o en puntas de pie), saltos, incoordinación motora, piloerección, estereotipias (oler, masticar, o movimientos de cabeza), sacudidas de cabeza, escozor, alteración de la respiración. Los parámetros descritos se evaluaron a los 30, 90 y 120 minutos después de la administración oral de las sustancias.

Test de la “planche a trous” (Boissier et al., 1964)

Los animales se distribuyeron en cinco grupos: un grupo control negativo (cloruro de sodio 0,9%, 10 mL/kg), un grupo control positivo (diazepam 20 mg/kg, QUIMEFA, Cuba) y tres grupos tratados (extracto etanólico de *E. clarensis* a las dosis de 200, 400 y 800 mg/kg).

A los 55 minutos de la administración oral se colocó el ratón sobre una plancha de agujeros

(planche à trous) de forma cuadrada de 40 x 40 cm provista de 16 agujeros dispuestos en cuatro filas, y que carecían de fondo (Sánchez Mateo, 1988). Los animales se mantuvieron sobre la plancha durante cinco minutos durante los cuales se anotó el número de veces que el ratón introdujo la cabeza en uno de los orificios (cuando lo hizo de forma repetitiva en uno de los orificios sólo se contabilizó una vez).

Test de la tracción (Boissier et al., 1961)

Los animales se distribuyeron en cinco grupos similar al test anterior. A 60 y 120 minutos, tras la administración oral de las correspondientes dosis, se tomó el tiempo que tardaron los ratones en poner las patas posteriores en la barra metálica. Se consideró como fracaso el hecho de que el animal tardara más de 60 segundos en agarrarse o tocar la barra con sus patas posteriores.

Eutanasia

La eutanasia en los ratones se realizó por dislocación cervical con previa anestesia en atmósfera de éter, según establece la AVMA, la Unión Europea y el Consejo Canadiense del Cuidado de Animales (EU, 2007; Charbonneau et al., 2010; AVMA, 2013).

Consideraciones éticas

Todos los investigadores respetaron los principios éticos que rigen la experimentación animal, garantizando el bienestar y la protección de estos, tanto por la sensibilidad humana ante el sufrimiento animal, como por garantizar la validez de los resultados obtenidos, cumpliéndose con las Normas de Bioética y Bioseguridad establecidas. Los estudios se realizaron cumpliendo las guías de buenas prácticas (WHO, 2004) para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Barthold et al., 2011).

Análisis estadístico

Los resultados son presentados como medias \pm desviación estándar. Se utilizó el paquete IBM SPSS v.22 para el análisis estadístico. La significancia estadística entre los grupos fue determinada por las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. Los valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) se indicaron como significativos.

RESULTADOS

Tamizaje fitoquímico

El extracto etanólico de *E. clarensis* al ser rotoevaporado a sequedad permitió obtener 3,79 g de extracto seco de color amarillo intenso, amorfo, con olor agradable y con un rendimiento de 18,96%.

Los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico (Tabla 1) y análisis cromatográfico (Tabla 2) del extracto analizado mostraron respuestas positivas para una diversidad de grupos funcionales. El análisis reveló la presencia de fenoles, taninos, triterpenos, esteroides, quinonas, flavonoides, coumarinas, resinas y azúcares reductores.

Tabla 1. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico procedente de las hojas de *E. clarensis*.

Ensayo	Metabolito	Resultados
Dragendorff	Alcaloides	-
Baljet I-II	Coumarinas	+++
Resinas	Resinas	+
Espuma	Saponinas	-
Kedde I-II	Glicósidos cardiotónicos	-
Cloruro férrico	Fenoles y/o taninos	+++
Shinoda	Flavonoides	++
Liebermann - Buchard	Triterpenos y/o esteroides	++
Fehling A-B	Azúcares reductores	+
Bortrager	Quinonas	++
Ninhidrina	Aminoácidos libres	-

Leyenda: +++ (ensayo muy positivo), + (ensayo positivo), - (ensayo negativo)

Evaluación *in vivo* de la actividad sobre el sistema nervioso central

Observación del comportamiento animal: Test de Irwin

Tras la observación del comportamiento animal siguiendo el esquema de Irwin, se encontró que el extracto etanólico procedente de *E. clarensis*, en general, modifica de manera ligera algunos pará-

metros establecidos en el protocolo (Tabla 3) a las dosis evaluadas de 200, 400 y 800 mg/kg.

Respecto a la observación de la conducta (Tabla 3), el extracto etanólico de *E. clarensis*, a todas las dosis ensayadas, presentó una ligera disminución de los parámetros conductuales como la agitación o intranquilidad, miedo o temor, acicalamiento y actividad locomotora. En los grupos tratados con el extracto se observó disminución leve a la actividad motora con afectación de la respuesta al tacto y al sobresalto en todas las dosis evaluadas, lo cual fue similar al grupo control positivo tratado con clorpromazina.

En cuanto al tono corporal, se observó su variación en los animales tratados con el extracto, según índices normales, retornando a su posición y una ligera disminución de la fuerza prensora al asirse moderadamente débil con las patas y/o la cola a la rejilla que le servía de soporte.

A nivel autonómico, la micción se presentó un poco exaltada en los grupos tratados especialmente a las dosis de 400 y 800 mg/kg.

Evaluación de la curiosidad

Al analizar los resultados de la actividad exploratoria evaluada mediante este test (Tabla 4) se notó en el grupo control positivo (diazepam), una disminución marcada del número de hundimientos de la cabeza de los animales en los agujeros de la plancha (13,00 ± 5,89). En relación a la respuesta de los grupos tratados con el extracto de *E. clarensis* se observó, que a todas las dosis ensayadas, específicamente a 800 mg/kg, el extracto redujo de manera significativa el número de veces que el ratón introdujo la cabeza en los agujeros en comparación con el grupo control negativo (p < 0,05).

Tabla 2. Resultados cromatográficos para el extracto etanólico de *E. clarensis* con la fase móvil n-hexano: acetato de etilo (7:3).

Rf	Vis.	UV (nm)		Vapores de amoniaco		AlCl ₃		Vainillina		
		254	366	Vis.	366	Vis.	366	Vis.	366	
Color de la mancha										
o	Pardo	Pardo	Pardo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo fluorescente	Violáceo	Pardo	
0,08	-	-	Rosa	-	Rojo	-	-	Violáceo	Amarillo naranja	
0,16	-	-	Rosa-naranja	-	Rojo - naranja	-	-	Violáceo	Pardo	
0,24	-	-	Rojo	-	Rojo	-	-	Violáceo	Pardo	
0,36	-	-	Rosa	-	Rosa	-	-	Primero Rosa, después Violáceo	Amarillo naranja	
0,6	Verde	Pardo	Rojo	-	Rojo	-	-	Verde olivo intenso	Pardo	
0,65	-	Pardo	Naranja	-	Amarillo	-	Amarillo	-	-	

Leyenda: -: no se observan manchas; Vis.: Visible

Tabla 3. Resumen de los efectos del extracto etanólico de *E. clarensis* sobre los perfiles conductual, neurológico y autonómico mediante el test de Irwin.

Perfil	Parámetros	Extracto etanólico de <i>E. clarensis</i> (mg/kg)		
		200	400	800
Conductual	Dispersión		+	+
	Actividad locomotora		-	-
	Agitación o intranquilidad	-	-	-
	Estado de alerta	-	-	--
	Miedo o temor		-	--
	Acicalamiento	-	-	-
	Respuesta al tacto	-	-	-
	Respuesta al dolor			-
	Respuesta sobre salto	--	--	--
	Catalepsia	-	-	-
	Reflejo pineal	-	-	-
	Reflejo homolateral	-	-	-
Neurológico	Fuerza prensora	-	-	-
Autonómico	Urinación		+	+

Leyenda:

+ Aumento de síntomas a partir de su nivel normal

-- Disminución marcada de síntomas de su nivel normal

- Disminución de síntomas a partir de su nivel normal

Cuando no aparecen signos es un comportamiento normal.

Tabla 4. Resultados de la actividad exploratoria mediante el método la "planche à trous".

Grupo experimental	Dosis	X (media ± DS)
NaCl 0,9%	10 mL/kg	34,17 ± 10,27 ^a
Diazepam	20 mg/kg	13,00 ± 5,89 ^b
<i>E. clarensis</i>	200 mg/kg	24,50 ± 6,80 ^c
<i>E. clarensis</i>	400 mg/kg	24,83 ± 10,68 ^c
<i>E. clarensis</i>	800 mg/kg	19,50 ± 8,96 ^d

Leyenda: (X) Número de veces de introducción de cabeza al orificio de los animales de cada grupo experimental.

Los datos se expresan como media ± desviación estándar (media ± DS) de n= 6. Letras diferentes muestran diferencias significativas con p < 0,05.

Test de la tracción

Los registros del tiempo que tardaron los animales en agarrarse a la barra con sus patas traseras (Tabla 5) mostraron que los animales que formaron el grupo control positivo (diazepam) tardaron un mayor tiempo en reaccionar ($56,67 \pm 6,05$ segundos) respecto al grupo control negativo ($0,97 \pm 0,08$ segundos) a los 60 minutos. Los animales de los grupos tratados con el extracto, a las diferentes dosis ensayadas, presentaron mayores tiempos de reacción del animal en comparación con el grupo control negativo.

Tabla 5. Tiempo que los ratones tardaron en asirse con las extremidades posteriores a la barra mediante el test de tracción.

Grupo	Dosis	Tiempo (s) (media \pm DS)	
		60 min	120 min
NaCl	10 mL/kg	$0,97 \pm 0,08^a$	$0,88 \pm 0,20^a$
Diazepam	20 mg/kg	$56,67 \pm 6,05^b$	$58,00 \pm 4,89^b$
<i>E. clarensis</i>	200 mg/kg	$1,50 \pm 0,54^{a,c}$	$2,33 \pm 0,81^c$
<i>E. clarensis</i>	400 mg/kg	$2,00 \pm 0,89^c$	$2,33 \pm 0,81^c$
<i>E. clarensis</i>	800 mg/kg	$2,16 \pm 0,75^c$	$2,50 \pm 0,54^c$

El tiempo en segundos es referido como el tiempo en que los ratones de cada grupo tardaron en asirse con las extremidades posteriores a la barra metálica en test de tracción a los 60 minutos y 120 minutos tras la administración de los productos correspondientes. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar (media \pm DS) de $n = 6$. Letras diferentes muestran diferencias significativas con $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

A pesar del enorme progreso experimentado en los últimos años en el desarrollo de nuevos fármacos, y la selectividad creciente hacia las dianas específicas, la presencia de efectos secundarios es frecuente. Es por ello que, la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos más eficaces y seguros continúa siendo una parte importante de la investigación farmacéutica. En este sentido, el reino vegetal resulta una fuente valiosa de nuevos agentes farmacológicos, las plantas medicinales poseen una diversidad de metabolitos secundarios donde hasta el momento sólo han sido investigados una pequeña parte (Bonkanka, 2007).

El tamizaje aleatorio y el estudio fitoquímico son las herramientas más beneficiosas en el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos, espe-

cialmente cuando el conocimiento tradicional no está disponible (Touqeer, 2015).

El tamizaje fitoquímico es una de las etapas intermedias de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés (Osorio, 2009). Los metabolitos secundarios detectados en el extracto evaluado pudieran desempeñar una amplia gama de efectos biológicos, actuando de una u otra manera sobre el SNC. Estos efectos son de amplia utilidad para la terapéutica racional, sin embargo, también pueden interferir en algunos aspectos importantes de seguridad (Acosta y Renzo, 2013).

Actualmente existen diferentes pruebas designadas para evaluar estos efectos (Kukuia et al., 2012). Una de ellas es el test de Irwin, considerado una herramienta de gran valor en la detección de la potencial actividad de un fármaco u otras sustancias sobre el SNC o periférico, a la vez que puede indicar posibles efectos en otros órganos o sistemas, por lo que debe considerarse como una prueba orientadora, de carácter general (Bu et al., 2011). Aunque es una prueba subjetiva, aporta datos importantes sobre el comportamiento (percepción, estereotipia, pasividad), actividad motora, tono muscular, reflejos o sistema autónomo (Sánchez Mateo, 1988).

En el test de Irwin, respecto a la observación de la conducta (Tabla 3), el extracto etanólico de *E. clarensis* a todas las dosis ensayadas presentó una ligera disminución en los parámetros conductuales de los animales. La dispersión en la jaula se observó ligeramente afectada en particular a los 30 y 90 minutos en las tres dosis, en mayor grado en la dosis de 400 y 800 mg/kg. De igual forma se presentaron signos de ligera disminución de la actividad locomotora, agitación o intranquilidad, miedo o temor y acicalamiento los cuales puede ser resultado del efecto sedativo, deterioro o debilitación motora por la acción de una sustancia incluido el efecto antidepresivo (Porsolt et al., 2002).

Como consecuencia de lo anterior, se consideró necesaria la realización del test de la curiosidad para corroborar este efecto (Zavala-Flores et al., 2014). Los resultados obtenidos tras la realización de dicho test, permitieron observar el grado de capaci-

dad exploratoria y curiosidad de los animales de experimentación. La prueba ha sido aceptada como un modelo experimental para la evaluación de condición psicótica, sedativa y ansiedad en animales de experimentación. En relación a la respuesta de los grupos tratados con el extracto de *E. clarensis*, se observó que a todas las dosis ensayadas, específicamente a 800 mg/kg, el extracto redujo de manera significativa ($p < 0,05$) el número de veces que el ratón introdujo la cabeza en los agujeros en comparación con el grupo control negativo, manifestando cierta acción sedante, lo cual expresa una posible inhibición cortical del SNC, hecho que podría sustentarse en la afinidad de los metabolitos secundarios presentes en dicho extracto como los esteroides y/o terpenos, las coumarinas y los flavonoides por receptores GABA (Monforte et al., 2002; Estrada-Reyes et al., 2012; Zavala-Flores et al., 2013).

Los flavonoides destacan desde el punto de vista farmacológico por su baja toxicidad y por presentar numerosos efectos biológicos y actividades terapéuticas (Estrada-Reyes et al., 2012). En cuanto a sus efectos sobre el SNC, experiencias realizadas con animales presentan a los flavonoides como posibles agentes neuroprotectores. La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, además de la inhibición de las oxidasas: lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos. Unido a ello, se ha comprobado que también inhiben las enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A₂; al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa (Sudheesh et al., 1999; Dajas et al., 2003; Limón et al., 2010). También se ha demostrado que algunos flavonoides (como hesperidina y crisiol) tienen actividad sedante e hipnótica, relacionándose directamente con la acción sobre los receptores benzodiazepínicos (Galani y Patel, 2009; Sierra-Pérez et al., 2013).

Dentro de la familia Myrtaceae, varias plantas se han referido por su actividad sedante como *Psidium guajava* L. (Argueta et al., 1994), *Myrtus communis* L. (Ormeño y Elvira, 2003), *Eucalyptus* sp. (Ceolin et al.,

2009) debido a la presencia de los flavonoides en esta familia (Grattapaglia et al., 2012).

Por otro lado, en el test de Irwin se observó una disminución en la fuerza prensora de los ratones, lo que sugirió la realización del test de la tracción para evaluar la acción del extracto sobre la coordinación motora de los animales, lo cual puede ocurrir por sedación y/o relajamiento muscular (Bonilla, 2013). El extracto administrado oralmente a las dosis de 200, 400 y 800 mg/kg presentó mayores tiempos de reacción del animal en comparación con el grupo control negativo existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$), lo cual pudiera indicar una posible acción miorelajante. Sin embargo, estos valores se encontraban dentro del rango normal establecido para la prueba (5 segundos) (Reddy et al., 2011), por lo que el efecto fue ligero.

A nivel autonómico, la micción se presentó aumentada en los grupos tratados, especialmente a las dosis de 400 y 800 mg/kg, por lo que se presume un posible efecto diurético que debe ser confirmado en pruebas posteriores. Estas observaciones resultan interesantes dada las múltiples aplicaciones de estos los fármacos diuréticos en tratamientos de insuficiencia cardíaca, edemas y ascitis en la cirrosis, edema agudo de pulmón, edemas del síndrome nefrótico, insuficiencia renal aguda y crónica, hipertensión arterial, entre otras (Flórez et al., 2014).

CONCLUSIONES

El extracto etanólico procedente de hojas de *E. clarensis*, a las dosis de 400 y 800 mg/kg, mostró un ligero efecto sedante sobre el sistema nervioso central sin afectar la coordinación motora. El estudio fitoquímico preliminar evidenció la presencia de metabolitos que pudieran contribuir a dicho efecto sedativo. El estudio infiere también un posible efecto diurético del extracto etanólico de *E. clarensis* a las dosis de 400 y 800 mg/kg lo cual puede ser considerado como punto de partida para estudios posterior de la especie.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al profesor Mario L. Sueiro por sus valiosas recomendaciones y la colaboración del profesor Norman Montenegro en el procesamiento estadístico de los resultados.

REFERENCIAS

- Acosta B, Renzo R (2013) Efectos neurofarmacológicos de la hoja de *Maytenus macrocarpa* "Chuchuhuasi" en *Mus musculus* mediante Test de Irwin. En: FMH-USMP (eds). Lima, pp 1-27.
- Argueta V, Cano L, Rodarte M (1994) Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista (vol.2):559.
- AVMA (2013) AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. Schaumburg: American Veterinary Medical Association.
- Barthold SW, Bayne K, Davis M (2011) Guide for the care and use of laboratory animals. Washington: National Academy Press.
- Benfatti CS, Cordova SMD, Guedes A, Magina MDA, Cordova CM (2010) Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp frente a cepas de mollicutes. Rev Pan-Amaz Saude 1: 33-39.
- Boissier J, Pagny J, Ratouis R, Dumont C (1961) Tentative de pharmacologie previsionnelle dans le domaine des neuroleptiques-actions sedative centrale et adrenolytique de la n (dimethoxy-3, 4 phenethyl) n'(chloro-2 phenyl) piperazine. Archs Int Pharmacodyn Ther 133: 29-49.
- Boissier J, Simon P, Lwoff J (1964) L'utilisation d'une réaction particulière de la souris (méthode de la planche à trous) pour l'étude des médicaments psychotropes. Therapie 19: 571-589.
- Bonilla J (2013) Determinación de la toxicidad, actividad sedante y ansiolítica del extracto acuoso de las flores de *Erythrina berteroa* (pito) en ratones NIH. Tesis de Diploma, Departamento de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador.
- Bonkanka C (2007) Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal. In: Servicio de publicaciones, Universidad de la Laguna (eds). Serie tesis Doctorales. España.
- Bu M, Sánchez N, Pérez-Saad H, Lara G, Scull I (2011) Efecto neurofarmacológico del zumo de *Morinda citrifolia*. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 10 (2): 159-161.
- Ceolin T, Heck R, Barbieri R, De Souza A, Rodrigues W, Vanini M (2009) Medicinal plants used as sedative by ecological farmers from Southern Rio Grande do Sul State, Brazil. Rev Enferm UFPE On line 3: 253-260.
- Charbonneau R, Niel L, Olfert E, Von Keyerserlingk M, Griffin G (2010) CCAC guidelines on: euthanasia of animals used in science. Canadian Council on Animal Care. Ottawa ON, Canada.
- Córdova-Acosta E, Vite F, Valverde PL (2012) Efecto de la orientación y caracteres de las flores en el éxito reproductivo de *Pachycereus weberi* en la región de Tehuacán-Cuicatlán. Bol Soc Latin Carib Cact Suc 9(1): 7-8.
- Dajas F, Rivera-Megret F, Blasina F, Arredondo F, Abin-Carriquiry J, Costa G, Echeverry C, Lafon L, Heizen H, Ferreira M (2003) Neuroprotection by flavonoids. Braz J Med Biol Res 36: 1613-1620.
- Estrada-Reyes R, Ubaldo-Suárez D, Araujo-Escalona AG (2012) Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. Salud Mental 35: 375-384.
- EU (2007) Recomendación de la comisión de 18 de junio de 2007 sobre las líneas directrices relativas al alojamiento y al cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Diario Oficial de la Unión Europea L 197.
- European Pharmacopoeia (2013) 8 ed., Council of Europe, Strasbourg, France.
- Floate K, Taylor W, Spooner R (1997) Thin-layer chromatographic detection of ivermectin in cattle dung. J Chromatogr B: Biomed Sci Appl 694: 246-251.
- Flórez J, Armijo J, Mediavilla A (2014) Farmacología humana, 6th edn. Elsevier, España.
- Frass M, Strassl RP, Friehs H, Müllner M, Kundi M, Kaye AD (2012) Use and acceptance of complementary and alternative medicine among the general population and medical personnel: a systematic review. Ochsner J 12: 45-56.
- Galani V, Patel B (2009) Psychotropic activity of *Sphaeranthus indicus* Linn. in experimental animals. Pharmacognosy Res 1: 307.
- Grattapaglia D, Vaillancourt RE, Shepherd M, Thumma BR, Foley W, Külheim C, Potts BM, Myburg AA (2012) Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. Tree Genet Genomes 8: 463-508.
- Irwin S (1968) Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. Psychopharmacologia 13: 222-257.
- Jorge N, Moreno DM, Bertanha BJ (2010) *Eugenia dysenterica* DC: actividad antioxidante, perfil de ácidos grasos y determinación de tocoferoles. Rev Chil Nutr 37: 208-214.
- Kukuia K, Ameyaw E, Mante P, Adongo D, Woode E (2012) Screening of central effects of the leaves of *Mallotus oppositifolius* (Geiseler) Mull. Arg. in mice. Pharmacologia 3: 683-692.
- Limón D, Díaz A, Mendieta L, Luna F, Zenteno E, Guevara J (2010) Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. Mensaje Bioquím XXXIV: 143-154.
- Lock de Ugaz O (1994) Métodos en el estudio de productos naturales. Investigación Fitoquímica, 2da edn, Universidad Católica, Perú.
- Mahakittikun V, Soonthornchareonnon N, Foongladda S, Boitano JJ, Wangapai T, Ninsanit P (2013) A preliminary study of the acaricidal activity of clove oil, *Eugenia caryophyllus*. Asian Pac J Allergy and Immunol 32: 46-52.
- Miranda M, Cuellar A (2012) Farmacognosia y productos naturales, 2da edn. La Habana: Editorial Félix Varela.
- Monforte M, Trovato A, Rossitto A, Forestieri A, D'aquino A, Miceli N, Galati E (2002) Anticonvulsant and sedative

- effects of *Salvadora persica* L. stem extracts. *Phytother Res* 16: 395-397.
- Ormeño C, Elvira L (2003) Evaluación técnica-económica del segundo año de cultivo de seis especies de follaje. Tesis de Diploma, Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso, Chile.
- Osorio E (2009) Aspectos básicos de farmacognosia. Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia.
- Porsolt RD, Lemaire M, Dürmüller N, Roux S (2002). New perspectives in CNS safety pharmacology. *Fundam Clin Pharmacol* 16: 197-207.
- Reddy K, Reddy C, Ganapaty S (2011) Psychopharmacological studies of hydro alcoholic extract of whole plant of *Marsilea quadrifolia*. *J Sci Res* 4: 279-285.
- Sánchez Mateo CDC (1988) Estudio farmacológico de una nueva serie de análogos tiofénicos de dibenzoacepinas. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, Tenerife. España.
- Sierra-Pérez RC, González-Canavaciolo VL, Marrero-Delange D, Rodríguez-Leyes EA (2013) Lamiaceae: una revisión sobre sus efectos neurofarmacológicos y su presencia en Cuba. *Rev CENIC Cienc Biol* 44(1): 1-17.
- Sudheesh S, Sandhya C, Sarah-Koshy A, Vijayalakshmi N (1999). Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytother Res* 13: 393-396.
- Torres-Cubiña MG (2012) Determinación de la actividad antioxidante de los extractos clorofórmico, etanólico y acuoso del arrayán, Calaguala, Canayuyo y Tipo. Tesis de Diploma, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- Touqeer S (2015) Ethnopharmacology and random screening. *J Pharm Pharmacogn Res* 3: 45-46.
- Valle MED (2008) Aislamiento y determinación de estructura química de principios activos presentes en *Eugenia uniflora*, centrado en los compuestos solubles en metanol. Tesis de M.Sc., Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- WHO (2003) Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales.
- WHO (2004) Laboratory biosafety manual, World Health Organization (eds).
- Zavala-Flores E, Goicochea-Lugo S, Agurto-Muñoz T, Adrianzen-Rodríguez S, Coronel-Bustamante G, Salazar-Granara A (2013) Dosis-respuesta sobre la motilidad intestinal y el sistema nervioso de la interacción entre *Jatropha curcas* L. y metoclopramide. *Acta Méd Peruana* 30: 120-127.