



(12)

SOLICITUD de PATENTE

(43) Fecha de publicación: **03/08/2007**

(22) Fecha de presentación: **19/04/2007**

(21) Número de solicitud: **2007004690**

(86) Número de solicitud PCT: **BR 05/00217**

(87) Número de publicación PCT: **WO 2006/042389 (27/04/2006)**

(30) Prioridad(es): **20/10/2004 BR PI040.6124-I**

(71) Solicitante:
**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE
MESQUITA FILHO-UNESP
Alameda Santos, 647/16º Andar Sao Paulo BR**

(72) Inventor(es):
**BOLZANI VANDERLAN DA SILVA
Av. Professor Degni Quitandinha Araraquara-
Sp CEP-14800-900 BR
RICARDO LUIS NUNES DE SOUZAFLAUSINO
OTAVIO APARECIDO, JR.**

(74) Representante:
**JOSE PABLO PEREZ ZEA.*
Campos Eliseos No. 345, 3er. Piso Distrito
Federal 11560 MX**

(54) Título: **EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE ERYTHRINA MULUNGU, COMPOSICIONES FARMACEUTICAS Y PROCESOS PARA PRODUCIR ESTAS SUSTANCIAS.**

(54) Title: **HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF ERYTHRINA MULUNGU, PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND PROCESSES FOR PRODUCING THESE SUBSTANCES.**

(57) Resumen

La presente invención proporciona el uso de las moléculas de los modelos del sistema colinérgico y/o serotoninérgico, revelando compuestos farmacéuticos que incluyen 11-OH-eritrina, eritrina, eritartina, farmacéuticamente aceptables isómeros, sales, subproductos y/o solvatos de los mismos, que opcionalmente contengan otros subproductos de eritrina, para el tratamiento de trastornos de ansiedad; también se revelan los procesos para obtener los dichos compuestos farmacéuticos.

(57) Abstract

The present invention provides the use of molecules for cholinergic and/or serotonergic system models, revealing pharmaceutical compositions comprising 11-OH-erythrine, erythrine, erythartine, pharmaceutically acceptable isomers, salts, byproducts and/or solvates thereof, optionally containing other erythrine byproducts, for the treatment of anxiety disorders; processes for obtaining said pharmaceutical compositions are also revealed.

EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE ERYTHRINA MULUNGU, COMPOSICIONES
FARMACÉUTICAS Y PROCESOS PARA PRODUCIR ESTAS SUSTANCIAS

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se refiere a las moléculas que actúan en los sistemas colinérgicos y/o serotoninérgicos. De manera más específica, la presente invención se refiere a los subproductos de eritrina útil en la preparación de medicamentos ansiolíticos. También se proporcionan los compuestos Farmacéuticos que incluyen las dichas moléculas y los procesos para la preparación los dichos compuestos farmacéuticos

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La *Erythrina mulungu* (Papilionaceae-Leguminosae) es una planta arbórea (10-14 metros de altura) con una floración roja, y crece en los bosques de hojas semicaducas de la cuenca del Paraná y regiones de montes bajos, principalmente en la región oeste del Estado de San Paulo y Minas Triangle (LORENZI, 1992). La corteza de la planta se utiliza por la población local como un tranquilizante y sedante. Se le conoce popularmente como mulungu, árbol coral, coral mulungu, arbusto coral (nombres étnicos incluyen *capa-homem*, *suiná-suiná*, *tiriceiro* entre otros) (LORENZI, 1992). Ocho variedades de Eritrina se encuentran en Brasil: *E. mulungu*, *E. velutina*, *E. crita-*

galli, *E. poeppigiana*, *E. fusca*, *E. falcata*, *E. speciosa* y *E. verna* (LORENZI, 1992). A pesar de la escasez de estudios de las especies *E. mulungu*, mucho trabajo se ha elaborado para establecer las propiedades fotoquímicas y farmacológicas de
5 otras especies de la variedad, que también son conocidas por su uso popular como sedantes, tranquilizantes y también como agentes laxantes, antiinflamatorios y antidiuréticos (GARÍN-AGUILAR y otros, 2000).

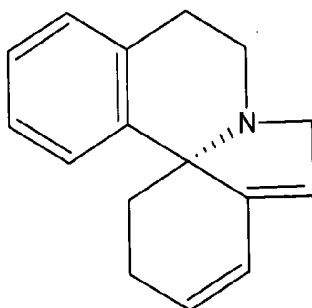
10 Fitoquímica

El interés en el estudio de las especies *Erythrina* inició en 1877 cuando Domínguez y Altamirano descubrieron que la acción farmacológica del extracto de la
15 semilla de la *E. americana* era similar a los efectos de *d*-tubocurarina (substancia extraída de *Chondodendron tomentosum*) (HARGREAVES y otros, 1974; HIDER y otros, 1986; GARÍN-AGUILAR y otros, 2000). A partir de ese momento, las investigaciones se realizaron sobre las propiedades
20 fotoquímicas y farmacológicas de los extractos de diferentes especies de *Erythrina*. Años después, después de la confirmación de que la acción farmacológica se manifestaba en los extractos de varias especies de *Erythrina*, la investigación se intensificó hacia el aislamiento e
25 identificación de los alcaloides en plantas de este tipo (SARRAGIOTO y otros, 1981). En aquellos tiempos, las pruebas farmacológicas se realizaban en extractos crudos. En 1937, Folkers y Major (1937) realizaron investigaciones químicas de

las semillas de la *E. americana* Mill y aislaron un alcaloide cristalino, eritroidina, la cual presenta actividad colinérgica similar a la de *d*-tubocurarina. Análisis subsiguientes (BOEKELHEIDE y GRUNDON, 1953; BOEKELHEIDE y
5 otros, 1953) mostraron que eritroidina era una mezcla de dos alcaloides isoméricos denominados α -eritroidina y β -eritroidina, la última siendo responsable de la actividad colinérgica (HARGREAVES y otros, 1974; HIDER y otros, 1986; GARÍN-AGUILAR y otros, 2000). Después de aislar α y β -
10 eritroidina de *E. americana*, se estudiaron otras especies de *Erythrina*, dando como resultado de nuevos alcaloides aislados del esqueleto de alcaloides eritrina (FOLKERS and KONIUSZY, 1940; FOLKERS y otros, 1944; BOEKELHEIDE and GRUNDON, 1953; BOEKELHEIDE y otros, 1953; TANDON y otros, 1969; ITO y otros,
15 1970; BARTON y otros, 1970; GHOSAL, 1970; GHOSAL y otros, 1971; ITO y otros, 1971; MIANA y otros, 1972; GHOSAL y otros, 1972 a,b; BARTON y otros, 1973; ITO y otros, 1973, a,b,c,d; GHOSAL and SRIVASTAVA, 1974; MILLINGTON y otros, 1974; GAMES y otros, 1974; ITO y otros, 1976; BARAKAT y otros, 1977; EL-
20 OLEMY y otros, 1978; AHMAD y otros, 1979; TIWARI and MASSOD, 1979a,b; SARRAGIOTO y otros, 1981).

El esclarecimiento sobre la estructura básica de los alcaloides de eritrina se logró mediante degradación y
25 síntesis (GRUNDON and BOEKELHEIDE, 1953; GRUNDON y otros, 1953; WEINSTOCK and BOEKELHEIDE, 1953; BOEKELHEIDE y otros, 1953). La presencia de un esqueleto espiroamínico se estableció en la estructura de estos alcaloides, los cuales

presentan la formula general que figura a continuación (representando un alcaloide eritrina del tipo diénico).



5

El esclarecimiento de esta estructura facilitó la identificación subsiguiente de nuevos compuestos. Actualmente, se conocen tres tipos de alcaloides de eritrina. Los dienoides presentan un sistema diénico en los anillos A y B. Los alcaloides tienen un doble enlace $\Delta^{1,6}$ en el anillo A. El tercer grupo de alcaloides de eritrina incluyen: erisodienona, 3-desmetoxi eritratidinona, α -eritroidina y β -eritroidina. También se aislaron algunos alcaloides de ciertas especies de *Erythrina* que no presentan esqueleto eritrina, incluyendo: orientaline, N-Noorientaline, protosinomenine, N-Norprotosinomenine, isoboldina, erybidine, scourelina, scourelina, hypaforin, colina.

Un estudio fotoquímico de *E. mulungu* utilizando extracto de etanol preparado con flores secas aisló cinco alcaloides (erisotrina, N-oxido de erisotrina, eritrartina, N-oxido de eritrartina e hipaforin) y un terpenoide, fitol (SARRAGIOTO y otros, 1981; SARRAGIOTO, 1981). Estudios

fotoquímicos recientes han demostrado que las especies de *Erythrina* también son ricas en otras clases de sustancias, tales como flavanonas, isoflavanonas, isoflavonas y pterocarpanos (DA-CUNHA y otros, 1998; TANAKA y otros, 1996, 1997 a,b; 1998; 2001; OH y otros, 1999; YENESEW y otros, 2000; NKENGFAK y otros, 2001).

Actividades Farmacológicas

Entre las principales acciones farmacológicas de las sustancias obtenidas de *Erythrina* está la actividad periférica del sistema colinérgico, la cual ha sido comparada a los efectos secundarios de *d*-tubocurarina (HARGREAVES y otros, 1974; HIDER y otros, 1986; GARÍN-AGUILAR, y otros, 2000). Este efecto se le atribuyó al alcaloide dihidro- β -eritroidina (DHBE), un receptor antagonista tipo nicotina (HIDER y otros, 1986) aislado de *E. americana* (BOEKELHEIDE and GRUNDON, 1953; BOEKELHEIDE y otros, 1953) y *E. tholloniana* (CHAWLA y otros, 1985). Más recientemente, en una prueba *in vitro*, DHBE se caracterizó como un antagonista del receptor serotoninérgico 3 (5-HT_3) (ELSELE y otros, 1993).

Algunas especies de la variedad *Erythrina* también presentan otras actividades en el Sistema Nervioso Central, tal como un efecto anticonvulsivo, hipnótico, anestésico, sedativo y ansiolítico (GHOSAL y otros, 1972; HARGREAVES y otros, 1974; RATNASOORIYA and DHARMASIRI, 1999; ONUSIC y otros, 2002). Sin embargo, ningún estudio reportado ha analizado el papel de los alcaloides de eritrina en estas actividades.

Un estudio de *E. velutina* demostró que el tratamiento agudo con extractos hidroalcohólicos disminuyó la actividad de los ratones en una prueba de campo abierto (con
5 dosis de 250 y 500 mg/kg, toma oral), y también aumentó el periodo de sueño inducido por pentobarbital y el periodo de inicio de la convulsión inducida por pilocarpina (con dosis de 500 y 1000 mg/kg, toma oral), indicando un efecto depresivo en el Sistema Nervioso Central (CABRAL y otros,
10 2000). Otro trabajo (GARÍN-AGULIAR y otros, 2000) reveló que el tratamiento agudo con la fracción hexánica de *E. americana* (3 mg/kg, i.p) disminuyó el comportamiento agresivo en los ratones machos, de manera similar al diazepam. Recientemente, un estudio sobre el extracto hidroalcohólico de *E. mulungu*
15 (ONUSIC y otros, 2002) observó que el tratamiento agudo con una dosis de 200 mg/kg (toma oral) presentó un efecto ansiolítico en los ratones en la tarea de evitación inhibitoria en la prueba de laberinto en T elevado, comparable al del ansiolítico benzodiazepínico (BDZ),
20 diazepam. ONUSIC y colaboradores (2002) también observaron el efecto ansiolítico de *E. mulungu*, con la misma dosis, en el modelo de transición luz/oscuridad, en ambos en el número de transiciones entre el modelo de dos compartimentos así como de permanencia en el compartimiento de luz. Otro trabajo
25 reveló que el tratamiento crónico de toma oral (9 días) con el extracto de *E. mulungu* presentó un efecto ansiolítico, con dosis de 50, 100 y 200 mg/kg, en ambos en tarea de evitación inhibitoria, así como en el escape de los brazos

abiertos en el laberinto en T elevado (ONUSIC y otros, 2003).

En el modelo de transición luz/oscuridad, el extracto de *E. mulungu*, con una dosis de 50 mg/kg, también presentó un efecto ansiolítico después de un tratamiento de 14 días

5 (ONUSIC y otros, 2003).

A pesar de estos innumerables enfoques, a la fecha no existe ningún reporte conocido del desarrollo de los medicamentos ansiolíticos elaborados de los principios

10 activos aislados de la *Erytrina*, o de la síntesis química de los mismos, ni de algún proceso para preparar dichos medicamentos.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

15

El tema objeto de la presente invención es proporcionar las moléculas capaces de actuar en los sistemas colinérgicos/ serotoninérgicos y los compuestos farmacéuticos que incluyan los mismos.

20

En otro aspecto, las moléculas de la presente invención han probado ser ansiolíticos activos en modelos animales. Por lo tanto, el tema objeto de la presente invención es proporcionar moléculas útiles en el tratamiento

25 de los trastornos relacionados con la ansiedad u otras manifestaciones clínicas que requieran el uso de ansiolíticos.

En otro aspecto, el aislamiento, la caracterización estructural y la evaluación de la actividad farmacológica de las moléculas de la presente invención permiten el desarrollo de compuestos farmacéuticos estandarizados destinados al tratamiento de trastornos de ansiedad.

Por lo tanto, otro tema objeto de la presente invención es proporcionar los compuestos farmacéuticos que incluyan moléculas ansiolíticas.

Además en otro aspecto, el aislamiento y/o síntesis de las moléculas de la presente invención proporcionan procesos facilitados para producir compuestos farmacéuticos que incluyan las dichas moléculas. Por lo tanto, tema objeto de la presente invención es proporcionar procesos para la producción de compuestos farmacéuticos.

DESCRIPCIÓN DE LA FIGURA

20

La Figura 1 muestra un esquema general ilustrativo de las etapas de extracción y fraccionamiento del extracto hidroalcohólico crudo de *E. mulungu* y el aislamiento de los alcaloides eritrartina, eritravina y 11-OH-eritravina utilizando el extracto hidroalcohólico crudo de *E. mulungu*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Para los fines de la presente invención, "compuestos farmacéuticos" significarán todos y cualquier compuesto que contenga el principio activo, con fines profilácticos, paliativo y/o curativos, actuando para mantener y/o restaurar la homeostasis y pueda ser administrado tópicamente, parentalmente, oralmente y/o intercaladamente.

10

Los compuestos farmacéuticos referidos en la presente invención pertenecen a la clase de subproductos de eritrina e incluyen 11-OH-eritravina, isotherals isóteros, sales, subproductos y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, opcionalmente conteniendo eritrartina y/o eritravina aislados de *Erythrina mulungu* ó químicos sintéticos.

Una aplicación terapéutica de los compuestos de la presente invención se llevó a cabo en varias etapas. Los experimentos realizados y sus respectivos resultados se presentan a continuación meramente como ejemplos, y no limitan el alcance de las reivindicaciones anexas.

25

**Ejemplo 1 - Preparación del extracto y fraccionamiento
utilizando materia vegetal**

Las flores se recogieron de árboles adultos
5 durante la temporada de invierno en el condado de Rifaina
(SP). La materia vegetal fresca (6 kg) se sometió a
extracción mediante un proceso de maceración con etanol/agua
(EtOH/H₂O) (7:3) durante 7 días. Después el extracto se
filtró y concentró con la asistencia de un evaporador
10 rotatorio, dando como resultado 292 g de extracto
hidroalcohólico seco. Después, se realizó el fraccionamiento
bio monitoreado y el aislamiento de los constituyentes
químicos. Por consiguiente, se realizó la extracción ácido-
base con el propósito de optimizar la separación de los
15 alcaloides eritrina. Para lograr esto, el extracto
hidroalcohólico (120 g) se disolvió en una solución acuosa de
ácido acético (10%) y se sometió a una extracción
líquido/líquido con cloroformo (CHCl₃). La fase cloroformo
se separó de la fase acuosa y el solvente se evaporó, dando
20 como resultado la fracción 1 (7.83 g). Posteriormente, la
fase acuosa se alcalinizó con hidróxido de amonio (NH₄OH) en
un volumen suficiente para alcanzar un pH de entre 9-10 y de
nuevo se sometió a la extracción con CHCl₃. La fase
cloroformo se separó y se evaporó el solvente, dando como
25 resultado la fracción 2 (F2) (670 mg).

Ejemplo 2 - Cromatografía, instrumentación y espectrometría

Para "el análisis" se utilizaron solventes grado. Para la cromatografía analítica en capa fina (CCD) en sílice, se utilizó el CHCl_3 /metanol (MeOH) (9:1) como sistema de solventes. La prueba Dragendorf para alcaloide fue positiva en **F2**, la cual fue sometida a una cromatografía en columna abierta (CCA) (5 cm de diámetro y 15 cm altura). Para la CCA (0,035-0,070 mm, ϕ 6 η m) se utilizó sílice en fase estacionaria y CHCl_3 /MeOH (10:0 - 8:2) como fase móvil.

Para la separación se utilizaron, 670 mg de **F2**, y se recabaron 101 fracciones de aproximadamente 20 ml. Después de haberla sometido a una CCD analítica, en fase móvil de CHCl_3 /MeOH (7:1) y reveló mediante el ensayo de Dragendorf, las 101 fracciones se agruparon en la fracción A (**FA** - 136.2 mg) (1-27), fracción B (**FB** - 93.4 mg) (28-50), fracción C (**FC** - 148.3 mg) (51-69), fracción D (**FD** - 284.5 mg) (70-101).

Para aislar y purificar los alcaloides, se utilizó la cromatografía en capa-fina preparativa (CCDP), empleando fluoresceína para la fase estacionaria de sílice (Merck) y para la fase móvil tolueno, acetona, etanol y NH_4OH (45:45:7:3). Para los análisis espectrométricos de las sustancias aisladas de la CCDP, se utilizó una resonancia magnética nuclear (NMR) espectrómetro Varian Unit operando a 500 MHz. Se utilizó cloroformo deuterado (CDCl_3) como solvente. Para determinar las estructuras químicas de los alcaloides aislados, se utilizaron espectrometrías NMR de ^1H and ^{13}C , así como las HMQC, HMBC y la espectrometría

bidimensional COSY. Los resultados se compararon a la información actualmente disponible en la literatura sobre alcaloides eritrina. El alcaloide 1 se aisló por medio de CCDP realizada con FB. Alcaloide 2 se aisló de ambos FC, y de FD. Utilizando FD, hizo posible que también se aislara el alcaloide 3. El espectro NMR de ^1H y ^{13}C en CDCl_3 para las sustancias 1, 2 y 3 (tabla 1) mostró la presencia de signos característicos del esqueleto de los alcaloides eritrina.

10 Tabla 1 - Medidas de desplazamiento químico (δ) y acoplamiento (J) de NMR (500 MHz) de ^1H y ^{13}C (in CD_3Cl) de eritrartina, eritravina y 11-OH-eritravina.

	eritrartina		eritravina		11-OH-eritravina	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	5.94 (d; 10,5)	131.52	5.9 (d 10,0)	134.18	6.01(d; 15,5)	135
2	6.52 (dd; 10,5; 2,5)	125.53	6.4 (dd; 10,0; 1,5)	124.96	6.56 (dd)	124.5
3	3.98 m	75.98	4.37 m	67.73	4.5 m	67.27
4	1.75 t	40.46	1.91 t	45.33	1.91t	43.9
	2.3 (dd; 11,5; 3,5)		2.5 (dd; 11,0; 5,0)		2.57dd	
5	-----	66.30	-----	67.11	-----	
6	-----	142.00	-----	141.88	-----	141.32
7	5.67 s	123.50	5.66 s	122.81	5.76s	124.45
8	3.81(d; 3,0)	58.71	3.58 d	56.45	3.99 d	58.78
	3.88 (dd)		3.7 d		3.93 d	
10	3.54 (dd; 14,0; 3,5)	50.92	3.05 (dd; 6,0; 4,5)	43.40	3.10 dd	50.83
	3.07 (dd; 14,0; 4,5)		3.50-3.53 m		3.59 dd	
11	4.64 t	64.55	2.9 (dd; 10,0; 6,5)	23.76	4.74 t	63.69
			2.6-2.7 m			
12	-----	128.32	-----	126.01	-----	?
13	-----	129.68	-----	130.61	-----	?
14	6.91 s	108.68	6.64 s	111.52	6.71s	108.36
15	-----	148.28	-----	147.19	-----	141.32
16	-----	148.52	-----	147.77	-----	148.76
17	6.77 s	110.33	6.83 s	109.16	6.93 s	110.36

15

Como se muestra en la tabla 1, es posible identificar signos de dos singletes para los protones

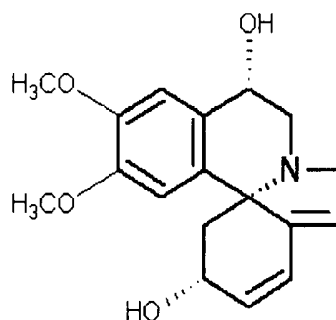
aromáticos relacionados a los hidrógenos H-14 y H-17 y dos singletes atribuidos a hidrógenos metoxil en la posición de carbonos C-15 y C-16. La presencia de tres signos de protones olefínicos (singlete ancho (sl), H-7; doblete ancho (dl), H-1; doble-doblete (dd), H-2), puede atribuirse a los hidrógenos del sistema diénico del esqueleto de eritrina. Aún cuando trabajos previos (Sarragiotto y otros, 1982) han reportado resonancias de C-1 y C-2 en δ 125.3 y δ 131.2, respectivamente, en el desarrollo de la presente invención, la correlación entre espectro bidimensional HMQC y los desplazamientos químicos demostró que todas estas resonancias ocurren a δ 131.5 y δ 125.5, respectivamente.

11-hidroxi-eritravina (11-OH-eritravina)

15

En el espectro NMR de ^1H para 11-OH-eritravina (tabla 2), de manera similar a la eritravina, no hubo signos de hidrógenos de metoxil en la posición C-3, en lo que respecta a la eritrartina, sólo un multiplete para eritrartina a δ 4.5 relacionado a un substituto oxigenado, atribuido a la posición C-3. De la misma manera se observó para eritrartina, el espectro de NMR ^1H y de ^{13}C reveló desplazamientos químicos a δ 4.74 (t) y δ 63.69, respectivamente, atribuidos a la presencia de un hidroxil in C-11. Estos resultados se están reportando por primera vez, y por lo tanto, se reconoció la sustancia 3 como siendo un nuevo alcaloide eritrina, y se le dio el nombre de 11-hidroxi-eritravina (11-OH-eritravina) La estructura química

del alcaloide 11-OH-eritravina, aislado del extracto crudo de las flores de *E. mulungu* se presenta a continuación.



5 Ejemplo 3 - Evaluación Farmacológica

Se utilizaron los ratones suizos pesando entre 25 y 35 g provenientes del laboratorio animal central de la Universidad Estatal de São Paulo (UNESP/Araraquara). Los animales se albergaron en grupos de 10-12 animales, en jaulas de polipropileno con viruta de madera en el piso, con alimento y agua *ad libitum*]. El laboratorio animal se mantuvo a una temperatura constante de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, la iluminación se controló en ciclos de 12-horas de 7:a.m. a 7:p.m. y la humedad se mantuvo entre 50-60%. La evaluación farmacológica se realizó con extracto, medicamento estándar y vehículo. Por consiguiente, se utilizó el extracto hidroalcohólico lifolizado (50, 100, 200 and 400 mg/kg), además de F2 (3, 6, 10, 17 y 30 mg/kg) y los alcaloides eritrartina, eritravina y 11-OH-eritravina (3 y 10 mg/kg), administrados vía oral mediante sonda gástrica. El medicamento estándar utilizado fue el Diazepam (DZP) en una dosis de 2 mg/kg (vía intraperitoneal, i.p). Todas las

soluciones se prepararon el día del experimento con clorato de sodio 0.9% y se sonicaron durante 15 minutos y el diazepam en una solución de clorato de sodio 0.9% y Tween-80. Los experimentos se realizaron entre las 11:00 am y 5:00 pm, y los aparatos para el experimento y los procedimientos se describen más adelante. El laberinto en T elevado está hecho con paredes de vidrio transparente y piso de madera y consiste de un brazo cerrado (30 x 5 x 15 cm) perpendicularmente enlazados a dos brazos abiertos (30 x 5 x 0.25 cm), elevado a 38.5 cm a distancia del piso mediante un soporte de madera. En esta prueba, se realizaron cinco medidas consecutivas de evitación inhibitoria (latencia basal, evitaciones 1, 2, 3 y 4) y una medida de escape de los brazos abiertos, con intervalos de 30 segundos entre cada intento. En las medidas de evitación, los animales se colocaron a una sección distal de la sección de brazos cerrados y la latencia de salida de este brazo, sobre todas las cuatro patas, hacia el brazo abierto se cronometró. En la medida de escape, los animales se colocaron en la extremidad de la mano derecha del brazo abierto y el tiempo se midió el tiempo de salida. El tiempo máximo que duraron los animales en los brazos del laberinto durante estas medidas fueron 300 segundos. El aparato se limpió con etanol 20% después de hacerle la prueba a cada animal. Para poder evitar falsos positivos o negativos, inmediatamente después de realizar la prueba en el laberinto en T elevado, los animales se sometieron a una prueba de actividad locomotora en la pista. El aparato consiste de una caja blanca de polipropileno con

una base rectangular (40 x 48 cm), rodeada por paredes de 30 cm de altura. El piso está subdividido en 30 cuadrados (8 x 8 cm). En esta prueba, los animales se colocaron en el centro de la caja y su actividad se grabó en video durante 5 minutos, para análisis posteriores del número de cruces de las áreas del cuadrante y el número de posturas de estiramiento-atención (WALSH and CUMMINS, 1976).

Todos los resultados de los modelos animales inicialmente se sometieron a la prueba de homogeneidad Levene. Los resultados heterogéneos se convirtieron en una escala logarítmica y posteriormente se analizó estadísticamente. Los resultados obtenidos del laberinto en T elevado se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con el tratamiento siendo un factor independiente y los intentos siendo un factor dependiente. Cuando el efecto del tratamiento probó ser significativo, los datos se analizaron utilizando el ANOVA de una vía seguido de la prueba Duncan *post hoc*. Los resultados obtenidos en la pista se sometieron a el ANOVA seguidos de la prueba Duncan *post hoc*. Cantidades $p \leq 0,05$ se consideraron como resultados significativos.

Prueba de Laberinto en T Elevado

25

Como se puede observar en la tabla 2, el 11-OH-eritravina dañó el desempeño de los animales en la tarea de evitación inhibitoria en el modelo de laberinto en T elevado.

El ANOVA de dos vías reveló una importante diferencia en el tratamiento ($F(3,33) = 8,30$; $p < 0,001$), de los intentos ($F(4,132) = 14,75$; $p < 0,0001$) y la interacción entre el tratamiento y los intentos ($F(12,132) = 2,42$; $p < 0,01$). El ANOVA de una vía mostró importantes diferencias entre los grupos en tratamiento E1 ($F(3,33) = 4,47$; $p < 0,01$), E2 ($F(3,33) = 5,29$; $p < 0,01$), E3 ($F(3,33) = 5,29$; $p < 0,01$) y E4 ($F(3,33) = 10,29$; $p < 0,0001$), pero no en la latencia basal ($F(3,33) = 0,51$; $p < 0,67$). La tabla 2 muestra las diferencias entre los grupos comparados con el grupo de control, según la prueba Duncan post hoc.

En cuanto a la medida de escape de los brazos abiertos, el ANOVA de una vía mostró que no existía diferencia entre los grupos en tratamiento al compararlos con el grupo de control ($F(3,33) = 0,71$; $p < 0,54$).

Tabla 2 - Efecto (promedio + EPM) del tratamiento agudo con 11-OH-eritravina en ratones sometidos a la prueba del laberinto en T elevado

Tratamientos	Evitaciones inhibitorias					Escape
	LB	E1	E2	E3	E4	
<u>SALINA</u>	32,6±5,3	107,7±37,9	142,6±41,7	165,0±37,7	232,8±35,5	21,8±3,1
<u>DZP 2 mg/kg</u>	24,6±4,1	15,3±3,8*	12,25±1,6*	22,3±7,7*	24,2±7,3*	19,0±3,2
<u>11-OH 3 mg/kg</u>	30,7±5,8	41,8±14,2	96,0±34,4	132,3±39,7	194,4±39,5	21,5±3,7
<u>11-OH 10 mg/kg</u>	22,6±3,5	30,0±6,1*	54,0±21,1	66,6±30,3*	94,8±31,7*	26,8±4,8

* $p < 0,05$.

Actividad Locomotora - Pista

El ANOVA de una vía mostró que ninguna de las dosis de 11-OH-eritravina utilizadas alteraron la actividad locomotora, en ambos en términos del número de cruces de los cuadrantes de la pista ($F(3,33) = 0,76$; $p < 0,51$), así como por el número de posturas estiramiento-atención ($F(3,33) = 1,20$; $p < 0,32$). Tabla 3 muestra los resultados obtenidos con la prueba de actividad locomotora.

10

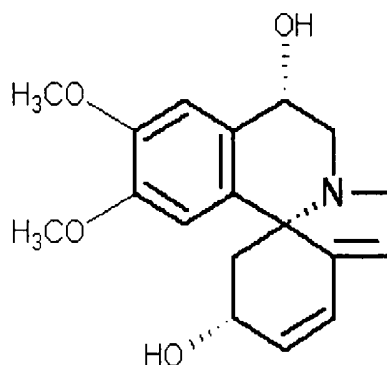
Tabla 3 - Efecto (promedio + EPM) del tratamiento agudo con el 11-OH-eritravina en la actividad locomotora de los ratones en la pista.

<u>Tratamientos</u>	<u>Cruces</u>	<u>Posturas estiramiento- atención</u>
<u>SALINA</u>	153,2 ± 22,66	25,2 ± 3,76
<u>DZP 2 mg/kg</u>	154,6 ± 19,48	19,13 ± 2,03
<u>11-OH 3 mg/kg</u>	158,5 ± 7,12	27,7 ± 3,20
<u>11-OH 10 mg/kg</u>	126,5 ± 12,71	22,4 ± 3,50

15

REIVINDICACIONES

1. Extracto hidroalcohólico de *Erytrina*
mulungu caracterizado porque incluye una sustancia que tiene
5 la formula general:



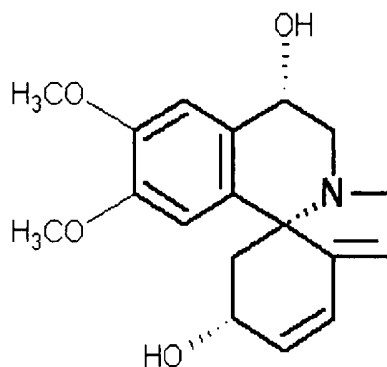
o isósteros, sales, y/o solvatos farmacéuticamente aceptables
de los mismos, asociados a las disfunciones del sistema
colinérgico y/o serotoninérgico.

10

2. El extracto hidroalcohólico, tal y como
se reivindica en la cláusula 1, caracterizado porque los
trastornos asociados a las disfunciones del sistema
colinérgico y/o serotoninérgico es la ansiedad.

15

3. La composición farmacéutica que contiene
un extracto hidroalcohólico de *Erytrina mulungu* caracterizado
porque incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable y por
lo menos una sustancia activa de la formula general:



o isósteros, sales, y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, asociados a las disfunciones del sistema colinérgico y/o serotoninérgico.

5

4. La composición farmacéutica tal y como se reivindica en la cláusula 3, caracterizada porque el trastorno asociado a las disfunciones del sistema colinérgico y/o serotoninérgico es la ansiedad.

10

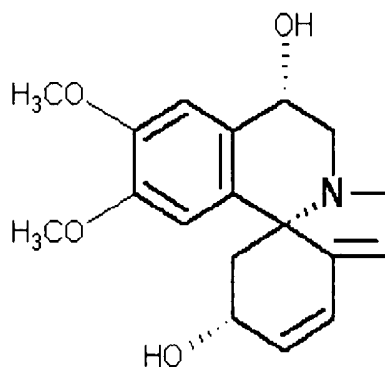
5. La composición farmacéutica tal y como se reivindica en las cláusulas 3 y 4, caracterizada porque también incluye eritrartina y/o eritravina.

15

6. Un proceso para producir medicamento para el tratamiento de los trastornos asociados con las disfunciones del sistema colinérgico y/o serotoninérgico caracterizado porque incluye las siguientes etapas:

20

- preparación de un vehículo farmacéuticamente aceptable; e
- incorporación a dicho vehículo de por lo menos una sustancia activa de la formula general:



o isósteros, sales y/o solvatos de los mismos.

7. El proceso de tal y como se reivindica en
5 la cláusula 6, caracterizado por agregar opcionalmente una
sustancia activa eritrartina y/o eritravina a dicho
vehículo.

8. El proceso tal y como se reivindica en la
10 cláusula 6, caracterizado por el hecho de que dicha sustancia
activa se obtiene de la extracción hidroalcohólica de las
plantas del genero *Erythrina*.

9. El proceso tal y como se reivindica en la
15 cláusula 9, caracterizado por el hecho de que dicha sustancia
se obtiene de la extracción hidroalcohólica de la especie de
plantas *Erythrina mulungu*.

R E S U M E N

La presente invención proporciona el uso de las moléculas de los modelos del sistema colinérgico y/o
5 serotonérgico, revelando compuestos farmacéuticos que incluyen 11-OH-eritravina, eritravina, eritrartina, farmacéuticamente aceptables isotherals, sales, subproductos y/o solvatos de los mismo, que opcionalmente contengan otros subproductos de eritrina, para el tratamiento de trastornos
10 de ansiedad; también se revelan los procesos para obtener los dichos compuestos farmacéuticos.

Figura 1

