



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DEL  
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE  
GUAYABA (*Psidium guajava*) EN RATONES (*Mus musculus*)”**

**Trabajo de Titulación**

**TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL**

Presentado para obtener el grado académico de:

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTOR: SEBASTIÁN PATRICIO PACHACAMA HUILCA**

**DIRECTORA: BQF. GISELA ALEXANDRA PILCO BONILLA M.sc**

Riobamba - Ecuador

2020

**©2020, Sebastián Patricio Pachacama Huilca**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Sebastián Patricio Pachacama Huilca soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica De Chimborazo.

Riobamba, 31 de agosto de 2020

Sebastián Patricio Pachacama Huilca

060394969-4

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: Tipo Experimental, **“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE GUAYABA (*Psidium guajava*) EN RATONES (*Mus musculus*)”**, realizado por señor **SEBASTIÁN PATRICIO PACHACAMA HUILCA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

**NOMBRE:**

**FIRMA**

**FECHA**

Bqf. Diego Renato Vinuesa Tapia, M.Sc.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Bqf. Gisela Alexandra Pilco Bonilla M.Sc

**DIRECTORA DE TRABAJO**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**DE TITULACIÓN**

Lic. Karen Lisseth Acosta León. M.Sc

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a mi familia, especialmente a mis padres Jiselli Huilca y Patricio Pachacama por guiarme en cada paso que doy en mi vida, por darme fuerzas para seguir cumpliendo mis sueños y lograr cada meta que me propongo.

A mis hermanos, Iván y Santiago por siempre estar a mi lado y brindarme excelentes consejos cuando más lo necesito.

A Jaritza, por cada palabra de aliento y haber formado parte de una etapa muy bonita de mi vida, sólo me queda decirle que si se pudo.

A mis abuelitos, tíos, primos y sobrinos, por ser una familia unida y brindarme su apoyo en cada momento de mi vida.

*Sebastián*

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por ser parte fundamental de mi vida, por darme sabiduría para manejar cualquier situación que se presente en mi vida, y por todas las bendiciones que derrama sobre mí.

A mi tutora BQF. Gisela Pilco por su guía y ayuda impartida durante en la realización de este trabajo de titulación.

A la Lic. Karen Acosta por compartir conmigo sus conocimientos, recomendaciones y su apoyo para culminar esta investigación.

Al Ing. David Moreno y Dr. Jorge Toapanta, docentes de la Facultad de Informática y Electrónica por su colaboración y guía en este proceso.

A mis padres que son el pilar indispensable de mi vida, les agradezco cada sacrificio, cada palabra de aliento que me brindaron durante toda esta etapa, y por su puesto el amor incondicional.

A mis amigos, por sus palabras de apoyo y siempre estar presentes cuando más los necesitaba: Eri, Vero, Gerardo y Benja.

*Sebastián*

## TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	xi
INDICE DE GRÁFICOS.....	xii
INDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>4</b>
<b><i>1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....</i></b>	<b><i>4</i></b>
<b>1.1. Marco referencial.....</b>	<b>4</b>
<b><i>1.1.1. Estadísticas de la ansiedad.....</i></b>	<b><i>4</i></b>
<b><i>1.1.2. Ansiedad y Depresión.....</i></b>	<b><i>5</i></b>
<b><i>1.1.3. Neurofisiopatología.....</i></b>	<b><i>6</i></b>
<b><i>1.1.4. Tratamientos de la ansiedad.....</i></b>	<b><i>7</i></b>
<b><i>1.1.5. Biodiversidad de Ecuador.....</i></b>	<b><i>9</i></b>
<b><i>1.1.6. Plantas medicinales utilizadas para la ansiedad.....</i></b>	<b><i>10</i></b>
<b><i>1.1.7. Psidium guajava.....</i></b>	<b><i>11</i></b>
<b><i>1.1.8. Estudios realizados de Psidium guajava.....</i></b>	<b><i>12</i></b>
<b><i>1.1.9. Modelos animales para el estudio de la ansiedad.....</i></b>	<b><i>13</i></b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>17</b>
<b><i>2. MARCO METOLÓGICO.....</i></b>	<b><i>17</i></b>
<b>2.1. Lugar de Investigación.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2. Identificación de la materia vegetal.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3. Recolección de la materia vegetal.....</b>	<b>17</b>

<b>2.4. Materiales, equipos y reactivos.....</b>	<b>18</b>
<i>2.4.1. Material vegetal .....</i>	<i>18</i>
<i>2.4.2. Material biológico.....</i>	<i>18</i>
<i>2.4.3. Lista de materiales, equipos y reactivos .....</i>	<i>18</i>
<b>2.5. Métodos y técnicas.....</b>	<b>21</b>
<i>2.5.1. Recolección, lavado y secado de la materia vegetal .....</i>	<i>21</i>
<i>2.5.2. Parámetros de control de calidad a la planta seca.....</i>	<i>21</i>
<i>2.5.3. Tamizaje o screening fitoquímico .....</i>	<i>23</i>
<i>2.5.4. Preparación del extracto hidroalcohólico de las hojas de GUAYABA (Psidium guajava).....</i>	<i>25</i>
<i>2.5.5. Control de calidad del extracto hidroalcohólico .....</i>	<i>25</i>
<i>2.5.6. Determinación de fenoles totales .....</i>	<i>27</i>
<i>2.5.7. Determinación de flavonoides totales.....</i>	<i>27</i>
<i>2.5.8. Actividad ansiolítica .....</i>	<i>27</i>
<i>2.5.9. Análisis estadístico.....</i>	<i>36</i>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>37</b>
<b>3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS. ....</b>	<b>37</b>
<b>3.1. Resultados de control de calidad de las hojas de guayaba (Psidium guajava).....</b>	<b>37</b>
<b>3.2. Resultados del Tamizaje Fitoquímico .....</b>	<b>38</b>
<b>3.3. Resultado del control de calidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de GUAYABA (Psidium guajava).....</b>	<b>40</b>
<b>3.4. Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu.....</b>	<b>41</b>
<b>3.5. Cuantificación de flavonoides totales por colorimetría .....</b>	<b>41</b>
<b>3.6. Actividad ansiolítica .....</b>	<b>42</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>67</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>68</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>.....</b>



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1 Medicamentos más utilizados en el tratamiento para la ansiedad; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 2-1 Medicamentos de primera elección del tratamiento para la ansiedad ..... **Error! Marcador no definido.**

Tabla 1-2 Lista de materiales, equipos y reactivos utilizados durante la investigación ..... **Error! Marcador no definido.**

Tabla 2-2 Grupos y tratamientos para la evaluación de la actividad ansiolítica de las hojas de Psidium guajava ..... **Error! Marcador no definido.**

Tabla 3-2 Criterios de medición en el Cuarto claro-oscuro ..... **Error! Marcador no definido.**

Tabla 4-2 Criterios de medición en el Laberinto en Cruz Elevado; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 5-2 Criterios de medición en el Campo Abierto ..... **Error! Marcador no definido.**

Tabla 1-3 Resultados obtenidos del Control de Calidad de droga cruda de las hojas de Guayaba (Psidium guajava) ..... **Error! Marcador no definido.**

Tabla 2-3 Resultados adquiridos del Tamizaje fitoquímico de las hojas de GUAYABA (Psidium guajava) ..... **Error! Marcador no definido.**

Tabla 3-3 Resultados del control de calidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de GUAYABA (Psidium guajava) ..... **Error! Marcador no definido.**

Tabla 4-3 Resultados de la cantidad de Fenoles totales de las hojas de Guayaba (Psidium guajava) ..... **Error! Marcador no definido.**

Tabla 5-3 Resultados de la cantidad de flavonoides totales de las hojas de GUAYABA (Psidium guajava) ..... **Error! Marcador no definido.**

Tabla 6-3 Resultados adquiridos del tiempo en cuarto claro y oscuro; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 7-3 Test ANOVA para el Tiempo Cuarto Claro y Tiempo Cuarto Oscuro ..... **Error! Marcador no definido.**

Tabla 8-3 Test TUKEY para el Tiempo Cuarto Claro y Tiempo Cuarto Oscuro ..... **Error! Marcador no definido.**

Tabla 9-3 Resultados de número de cruces del cuarto claro-oscuro, distancia recorrida y velocidad media ..... **Error! Marcador no definido.**

Tabla 10-3 Test ANOVA para cruces para cuarto claro-oscuro, distancia recorrida y velocidad media ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 11-3 Test TUKEY para cruces para cuarto claro-oscuro, distancia recorrida y velocidad media ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 12-3 Resultados del tiempo en Brazos Abiertos y Brazos Cerrados;**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 13-3 Test ANOVA para el Tiempo en brazos abiertos, y brazos cerrados ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 14-3 Test TUKEY para el Tiempo en brazos abiertos y brazos cerrados ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 15-3 Resultados del número de Entradas a Brazos Abiertos y Brazos Cerrados ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 16-3 Test ANOVA del número de Entradas a Brazos Abiertos y Brazos Cerrados. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 17-3 Test TUKEY del número de Entradas a Brazos Abiertos y Brazos Cerrados.. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 18-3 Resultados de la distancia Recorrida y Velocidad media;**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 19-3 Test ANOVA de Distancia recorrida y Velocidad media;**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 20-3 Test TUKEY para Distancia recorrida y Velocidad media;**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 21-3 Resultados del tiempo en el centro, interior, esquinas y laterales;**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 22-3 Test ANOVA para el tiempo en el centro, interior, esquinas y laterales ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 23-3 Test TUKEY para el tiempo en el centro, interior, esquinas y laterales ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 24-3 Resultados del Número de Elevaciones y Defecaciones;**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 25-3 Test ANOVA para el Número de Elevaciones y Defecaciones;**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 26-3 Test TUKEY para el Número de Elevaciones y Defecaciones;**¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 27-3 Resultados de la Distancia Recorrida y Velocidad media; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 28-3 Test ANOVA para Distancia Recorrida y Velocidad media; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 29-3 Test TUKEY para Distancia Recorrida y Velocidad media..... **Error! Marcador no definido.**

## **INDICE DE FIGURAS**

Figura 1-1 Psidium guajava..... **Error! Marcador no definido.**

Figura 2-1 Modelos de respuesta condicionada..... **Error! Marcador no definido.**

Figura 3-1 Modelos de respuesta incondicionada..... **Error! Marcador no definido.**

Figura 1-2 Punto de recolección de Psidium guajava ..... **Error! Marcador no definido.**

Figura 2-2 Esquema para el Tamizaje Fitoquímico ..... **Error! Marcador no definido.**

Figura 3-2 Esquema de los ensayos para el extracto etéreo ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 4-2 Esquema de los ensayos para el extracto alcohólico . **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 5-2 Esquema de los ensayos para el extracto acuoso ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 6-2 Equipo de medición “Cuarto claro-oscuro” ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 7-2 Programa ITOPI del “Cuarto claro-oscuro” ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 8-2 Equipo de medición “Laberinto en Cruz Elevado” ... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 9-2 Programa ITOPI del “Laberinto en Cruz Elevado”... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 10-2 Equipo de medición “Campo abierto” ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 11-2 Equipo de medición “Campo abierto” ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 12-2 Flujograma para determinar la actividad ansiolítica **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 13-2 Flujograma para determinar ANOVA..... **¡Error! Marcador no definido.**

## INDICE DE GRÁFICOS

Gráfica 1-3 Tiempos de estancia en el Cuarto Claro y Oscuro en los diferentes tratamientos  
..... **¡Error! Marcador no definido.**

Gráfica 2-3 Número de cruces del Cuarto Claro y Oscuro en los diferentes tratamientos . **¡Error!  
Marcador no definido.**

Gráfica 3-3 Distancia Recorrida en los diferentes tratamientos.. **¡Error! Marcador no definido.**

Gráfica 4-3 Velocidad Media en los diferentes tratamientos..... **¡Error! Marcador no definido.**

Gráfica 5-3 Tiempo en brazos abierto y brazos cerrados en los diferentes tratamientos ... **¡Error! Marcador no definido.**

Gráfica 6-3 Entradas en brazos abiertos y brazos cerrados en los diferentes tratamientos **¡Error! Marcador no definido.**

Gráfica 7-3 Distancia recorrida en los diferentes tratamientos ... **¡Error! Marcador no definido.**

Gráfica 8-3 Velocidad media en los diferentes tratamientos ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Gráfica 9-3 Tiempos de estancia en el centro, interior, laterales y esquina en los diferentes tratamientos..... **¡Error! Marcador no definido.**

Gráfica 10-3 Número de elevaciones y defecaciones en los diferentes tratamientos ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Gráfica 11-3 Distancia Recorrida en los diferentes tratamientos **¡Error! Marcador no definido.**

Gráfica 12-3 Velocidad media en los diferentes tratamientos .... **¡Error! Marcador no definido.**

## **INDICE DE ANEXOS**

**ANEXO A:** Preparación de la droga cruda

**ANEXO B:** Control de calidad de la droga cruda

**ANEXO C:** Tamizaje fitoquímico

**ANEXO D:** Control de calidad del extracto hidroalcohólico

**ANEXO E:** Concentración del extracto

**ANEXO F:** Cuantificación de flavonoides y fenoles totales

**ANEXO G:** Animales de experimentación

**ANEXO H:** Reconstitución del extracto seco con propilenglicol al 15%

**ANEXO I:** Manipulación y administración de los extractos en los animales de experimentación

**ANEXO J:** Equipos utilizados para determinar la actividad ansiolítica

**RESUMEN**

El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad ansiolítica del extracto hidroalcohólico de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*) en ratones (*Mus musculus*). La materia vegetal fue recolectada, secada, triturada y macerada con etanol al 70% durante tres días para su concentración. Se realizó el control de calidad de la droga seca y del extracto concentrado, para posteriormente ejecutar el tamizaje fitoquímico e identificar los metabolitos secundarios presentes en la planta. A continuación, el extracto se concentró hasta dejarlo seco y libre de alcohol. Para evaluar la actividad ansiolítica, se utilizaron 30 ratones machos con un peso de 25 - 30 g aproximadamente y una edad de 2 - 3 meses, los mismos que fueron agrupados de acuerdo al tratamiento que iban a recibir. Se utilizó propilenglicol al 15% como control negativo, Clonazepam como control positivo y los extractos a concentraciones de 25, 100, 200 y 300 mg/Kg. Se realizaron pruebas no condicionadas, con los equipos de: Cuarto Claro-Oscuro, Laberinto en Cruz Elevado y Campo Abierto. El comportamiento de los ratones en los distintos equipos fue grabado para posteriormente procesarlos en los programas ITOPI (Cuarto Claro-Oscuro y Laberinto en Cruz Elevado) y EMIS (Campo Abierto). Los datos obtenidos fueron analizados en el programa IBM® SPSS® statistics versión 22, determinando que las dosis de 200 y 300 mg/Kg presentan mayor actividad ansiolítica sin afectar la locomoción de los biomodelos. Se recomienda realizar estudios de toxicidad de las hojas de *Psidium guajava*, para analizar los posibles efectos y garantizar su uso.

**PALABRAS CLAVES:** <BIOQUÍMICA>, <FARMACIA>, <ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA>, <GUAYABA (*Psidium guajava*)>, < RATONES (*Mus musculus*)>, <CUARTO CLARO OSCURO>, <LABERINTO EN CRUZ ELEVADO>, < CAMPO ABIERTO>.

**LUIS  
ALBERTO  
CAMINOS  
VARGAS**

Firmado digitalmente por  
LUIS ALBERTO CAMINOS  
VARGAS  
Nombre de  
reconocimiento (DN):  
c=EC, i=RIOBAMBA,  
serialNumber=060276697  
4, cn=LUIS ALBERTO  
CAMINOS VARGAS  
Fecha: 2020.09.21 10:12:34  
-05'00'



0305-DBRAI-UPT-2020

## ABSTRACT

The objective of this research was to determine the anxiolytic activity of the hydroalcoholic extract of guava leaves (*Psidium guajava*) in mice (*Mus musculus*). The vegetable matter was

collected, dried, crushed and macerated with 70% ethanol for three days for its concentration. The quality control of the dry drug and the concentrated extract was carried out, to later execute the phytochemical screening and identify the secondary metabolites present in the plant. The extract was then concentrated to dryness and alcohol-free. To evaluate the anxiolytic activity, 30 male mice with a weight of approximately 25-30 g and an age of 2-3 months were used, which were grouped according to the treatment they were going to receive. Propylene glycol 15% was used as a negative control, Clonazepam as a positive control and the extracts at concentrations of 25, 100, 200 and 300 mg / Kg. Unconditional tests were carried out, with the teams of: Light-Dark Room, Elevated Cross Labyrinth and Open Field. The behavior of the mice in the different equipment was recorded for later processing in the ITOPI (Light-Dark Room and Elevated Cross Maze) and EMIS (Open Field) programs. The data obtained were analyzed in the IBM® SPSS® statistics version 22 program, determining that the doses of 200 and 300 mg / Kg present greater anxiolytic activity without affecting the locomotion of the biomodels. It is recommended to carry out toxicity studies of (*Psidium guajava*) leaves, to analyze the possible effects and guarantee its use.

KEY WORDS: <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACY>, <ANSIOLYTIC ACTIVITY>, <GUAVA (*Psidium guajava*)>, <MICE (*Mus musculus*)>, <LIGHT DARK ROOM>, <ELEVATED CROSS MAZE>, <OPEN FIELD>



## INTRODUCCIÓN

La ansiedad es un trastorno mental que se caracteriza por producir varias sensaciones como preocupación y miedo, las cuales pueden interferir con las actividades diarias de la persona que lo padece. Hoy en día existen muchos factores que provocan desórdenes de ansiedad como: los biológicos hereditarios, el ambiente familiar, estilo de vida, situaciones personales, eventos traumáticos del pasado y estrés cotidiano; actualmente una de las poblaciones más afectadas son los jóvenes debido a las pocas fuentes de trabajo, el costo de vida y la situación ambiental (Vindel, 2011, pág. 74) (Villarroel, 2008, pág. 103).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más de 264 millones de personas padecen del trastorno de ansiedad, su prevalencia es mayor en mujeres (4,6%) que en hombres (2,6%), debido a que son más propensa a la afectividad negativa o neuroticismo y a una mayor percepción de amenaza. Mientras que, los hombres muestran más reacciones de desprecio y son más propensos a negar la experiencia de otras emociones. De acuerdo con la OMS, Brasil es el país latinoamericano con más casos de este trastorno con un 9,3%. Ecuador se encuentra en el décimo lugar con un valor del 5,6% (EMOL, 2017) (Vignera, s.f.).

Los tipos de ansiedad se puede clasificar en 7: trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de pánico, trastorno obsesivo - compulsivo, trastorno por estrés postraumático, fobia social, agorafobia y fobia específica, donde cada una posee distintas características notables. La ansiedad y otras patologías se han estudiado en modelos animales y existen más de treinta utilizados. Los distintos estudios constan de respuestas condicionadas y otros modelos utilizan respuestas más naturales de la especie por lo cual son considerados de respuestas no condicionadas. Entre las pruebas de respuesta condicionada existen la prueba de conflicto y otras como evitación activa/pasiva, supresión condicionada, respuesta emocional condicionada y vocalizaciones ultrasónicas condicionadas. Dentro de las pruebas de respuesta no condicionada, se encuentran pruebas exploratorias como la del laberinto en cruz, transiciones luz/oscuridad y a campo abierto, también hay pruebas sociales y otras como la hiponeofagia y conducta defensiva de enterramiento (Corbin, s.f.) (Vargas & Góngora, 2011, pág. 108).

Existe un grupo de medicamentos para tratar el desorden de ansiedad conocida como los benzodiazepinas, éstas poseen efectos indeseables que incluyen: somnolencia, amnesia, confusión y trastornos en la coordinación, con un considerable deterioro de las habilidades manuales, reduciendo la facultad de operar maquinaria pesada. Sin embargo, el tratamiento farmacológico no es el único empleado, existen tratamientos alternativos como la relajación de

la actividad fisiológica, aromaterapia y el uso de plantas, las cuales tiene menos efectos adversos y menor dependencia en terapias prolongadas (MsC. Ana López Vantour, 2010, pág. 47) (Rubio, 2016, pág. 71).

Uno de los tratamientos alternativos más utilizados a nivel mundial son las plantas medicinales, aplicados mayoritariamente en países en vías de desarrollo. Los principales argumentos a favor de las plantas medicinales son la existencia de un gran abanico de futuras medicinas por descubrir, el apoyo de la medicina oficial y preventiva. Existen millones de plantas con principios activos que podrían curar diversas enfermedades que afectan a la población mundial, pero la mayoría no ha sido investigada (Botanical.online, s.f.).

Ecuador se caracteriza por su gran variedad de especies vegetales, pues existen bosques tropicales, selvas, páramos y desiertos. En la actualidad, se estima que existen 20000 especies, incluyendo helechos y plantas con semilla. La región más diversa es la andina por consiguiente de cada 100 especies ecuatorianas 64 son andinas, lo cual es un número importante para esta región. En la zona baja podemos encontrar arbustos aislados, manglares blanco y negro, cactus, palo santo, verbena, entre otras. En la zona alta, predomina el frío y la humedad es más tupida por lo que encontramos el guayabo, guayabilla, helechos, líquenes, musgos, etc. En la zona de clima templado se cultiva más el plátano, caña de azúcar, arroz, palmas, rábanos, zanahorias y otras hortalizas (Turismo, 2013).

La población utiliza las plantas medicinales debido al fácil acceso y bajo costo que ellas tienen, por último, algunas son más efectivas que los medicamentos existentes y son asimiladas más fácilmente por el cuerpo. Sin embargo, se debe utilizar con mucha responsabilidad, ya que si se usan en dosis no recomendadas puede causar daños a la salud de la persona y puede originar nuevas enfermedades (Antonacci, s.f.).

Estudios en animales demostraron que los extractos de hojas de *Psidium guajava* poseen actividad analgésica, sedante e interviene en la transmisión sináptica inhibitoria rápida de todo el sistema nervioso central (Joseph, George, & Mathews, 2016, págs. 1265-1267).

Las hojas contienen taninos, fenoles, flavonoides, triterpenos, esteroides, saponinas y compuestos aminados. Dentro de los compuestos fenólicos resalta la presencia de quercetina, la cual posee propiedades neuroprotectoras por lo que es utilizado para reducir los efectos del estrés y trastornos relacionados. Estudios realizados en ratones, mostraron que el pre-tratamiento con quercetina previene la respuesta de ansiedad al estrés experimental a través de la estabilización de los mastocitos, por lo que es altamente protector para el sistema nervioso (Juana Benedía, 2007, págs. 54-55) (Quercetina, s.f.).

## **OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **OBJETIVO GENERAL:**

- Determinar la actividad ansiolítica del extracto hidroalcohólico de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*) en ratones (*Mus musculus*).

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en las hojas de guayaba (*Psidium guajava*).
- Cuantificar los fenoles totales y flavonoides presentes en las hojas de guayaba (*Psidium guajava*), mediante el método de Folin Ciocalteu y el método de  $AlCl_3$ .
- Determinar a qué concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*) se obtiene mayor efecto ansiolítico.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

#### 1.1. Marco referencial

##### *1.1.1. Estadísticas de la ansiedad*

La prevalencia de los trastornos de ansiedad en todo el mundo varía de 2.5 a 7% por país. A nivel mundial, se estima que 284 millones de personas experimentaron un trastorno de ansiedad en 2017, lo que lo convierte en el trastorno de desarrollo mental o de salud mental más frecuente (OMS, 2019). Alrededor del 63% (179 millones) eran mujeres, frente a los 105 millones de hombres que lo padecen (Ritchie & Roser, 2018).

El inicio de la mayoría de los trastornos mentales de por vida ocurre durante la edad adulta y en muchos países, la mayoría de los adultos jóvenes de esta edad son estudiantes universitarios. En los Estados Unidos, por ejemplo, aproximadamente el 66% de los graduados de secundaria se matricularon en la universidad en el año escolar siguiente y la mitad de los adultos jóvenes asisten a la universidad. En países en desarrollo, como Ecuador, el número de adultos jóvenes que asisten a la universidad está aumentando; específicamente, la población universitaria ecuatoriana está creciendo anualmente en más del 4%, con un 39.6% de adultos jóvenes que asisten a la universidad en 2012, y se espera que esta cifra supere el 50% en 2017 (Torres, Otero, Bustamante, Blanco, & Vázquez, 2017, págs. 1 - 13).

Por lo tanto, los problemas de salud mental y el bienestar general de los estudiantes universitarios han sido objeto de una creciente investigación. Se ha encontrado un nivel elevado de angustia psicológica y síntomas entre los estudiantes universitarios. De hecho, la prevalencia de varios trastornos mentales se ha estimado de la siguiente manera: entre 5.3% y 17.3% para la depresión, entre 1.6% y 7.0% para el trastorno de ansiedad generalizada, entre 0.6% y 4.1% para el trastorno de pánico, entre 0.9% y 9.4% para los trastornos alimentarios y entre 0.6% y 9.5% para la ideación suicida (Torres, Otero, Bustamante, Blanco, & Vázquez, 2017, págs. 1 - 13).

### ***1.1.2. Ansiedad y Depresión***

#### ***Ansiedad***

El trastorno de ansiedad se caracteriza por una preocupación excesiva e inapropiada que es persistente y no se limita a circunstancias particulares. Los pacientes tienen síntomas de ansiedad física (como taquicardia y temblor) y síntomas psicológicos clave, que incluyen inquietud, fatiga, dificultad para concentrarse, irritabilidad y trastornos del sueño (Lader, 2015, pág. 32)

La ansiedad puede manifestarse en forma de crisis, miedo o peligros que puede llegar incluso a que la persona tenga pánico a ciertas horas del día. Este tipo de manifestaciones pueden darse tanto para niños como adultos sin depender del sexo, sin embargo, se conoce que esta patología afecta en especial a las mujeres a partir de la etapa reproductiva por la alteración hormonal que presenta (Sierra, Ortega, & Zubeidat, 2003, págs. 10 - 59).

Los trastornos de ansiedad surgen de varias formas, incluidos los trastornos fóbicos, sociales, obsesivos compulsivos (TOC), trastornos postraumáticos (TEPT) o trastornos de ansiedad generalizada (Ritchie & Roser, 2018).

Los síntomas y los criterios de diagnóstico para cada subconjunto de trastornos de ansiedad son únicos. La Clasificación Internacional de Enfermedades de la OMS (CIE-10) observa síntomas frecuentes de:

- aprensión (preocupaciones sobre desgracias futuras, sentirse "al límite", dificultad para concentrarse, etc.);
- tensión motora (inquietud, dolores de cabeza por tensión, temblor, incapacidad para relajarse);
- hiperactividad autónoma (aturdimiento, sudoración, taquicardia o taquipnea, molestias epigástricas, mareos, boca seca, etc.) (Ritchie & Roser, 2018).

#### ***Depresión***

La depresión tiene un alto impacto en la salud mental; sin embargo, su diagnóstico es un desafío incluso para los especialistas. Este problema deriva de una falla en una descripción adecuada y diferenciación de la enfermedad. Existe un sin número de características patológicas que afectan el comportamiento de la persona; factores clínicos, socioculturales, patógenos, entre otros (Botto, Acuña, & Jiménez, 2014, págs. 1297-1305).

### ***Problemas relacionados a la depresión***

Los cambios en el cerebro tienen efecto en muchos de los sistemas del cuerpo, es así que el funcionamiento anormal de los mensajeros cerebrales (neurotransmisores) como la serotonina puede alterar o afectar el sueño y reduce el deseo sexual (Goldberg, 2018).

Las personas que sufren depresión, a menudo pasan por alto los signos y síntomas físicos de la enfermedad. Los investigadores descubrieron que los problemas para dormir, la fatiga y las preocupaciones sobre la salud son indicadores confiables de depresión en los adultos mayores. Sin embargo, señalaron que estos signos se descartan de manera rutinaria e incorrecta, debido a que se consideran parte natural del envejecimiento (Goldberg, 2018).

La depresión afecta el estado de ánimo, pero también ocasiona algunos de los síntomas físicos más comunes como:

- Aumento de dolores y molestias, que ocurren aproximadamente en dos de cada tres personas con depresión.
- Fatiga crónica
- Disminución del interés en el sexo
- Disminución del apetito
- Insomnio, falta de sueño profundo o sueño excesivo.

#### ***1.1.3. Neurofisiopatología***

Los patrones de comportamiento más típicos de la ansiedad se fundamentan en sustratos neuroanatómicos activados en respuesta a la detección predecible (miedo) e impredecible de sucesos (Lowery-Gionta, DiBerto, & Louis, 2018, págs. 1 - 13).

En una extensa revisión sobre la ansiedad, Davis et al. (2010) presentaron hallazgos en animales y humanos que describen una superposición de redes en la zona de la amígdala. La amígdala central y lateral han sido consideradas el "centro" del cerebro en cuanto al miedo, enviando señales que facilitan las respuestas defensivas automáticas y que estimulan conductas de sobresalto y congelamiento (Lowery-Gionta, DiBerto, & Louis, 2018, págs. 1 - 13).

Una amenaza inmediata ocasiona una activación de la división medial del núcleo central de la amígdala (CeAM), que envía señales tanto al hipotálamo como al tronco encefálico para iniciar

procesos que admiten respuestas automáticas. Por el contrario, experiencias de amenazas impredecibles o distantes, como eventos que han ocurrido anteriormente, o la exposición a la oscuridad, están asociados con la activación de la amígdala extendida, que se cree activa reacciones de ansiedad más controladas. La activación lateral del núcleo central de la amígdala (CeAL) facilita la liberación de factores liberadores de corticotropina (CRF) desde el hipotálamo y el tallo cerebral. La CRF al parecer actúa en el núcleo del lecho de la estría terminalis (BNST), zona particularmente implicada en la ansiedad, pero que permite una distinción entre miedo y sustratos de ansiedad (Lowery-Gionta, DiBerto, & Louis, 2018, págs. 1 - 13).

La actividad del BNST es responsable del aumento de la hipervigilancia durante períodos anticipados de peligro impredecible; el trabajo previo con pacientes fóbicos demuestra no solo la activación de la amígdala y el BNST, también se ha observado la participación de la ínsula, la corteza del cíngulo anterior y la región periacueductal gris en respuestas de miedo. Se cree que la ínsula anterior (aINS) regula la respuesta frente a amenazas impredecibles y está implicada en la conciencia interoceptiva y las respuestas anticipatorias. Un aINS hiperreactivo durante la experiencia de una amenaza impredecible en personas con trastornos de ansiedad puede influir en las experiencias de angustia extrema y exagerada que interfiere con la capacidad de reconocer diferencias entre los estados físicos actuales y potenciales (Lowery-Gionta, DiBerto, & Louis, 2018, págs. 1 - 13).

Los comportamientos de preocupación y evitación característicos de la ansiedad puede ser el resultado del desajuste entre los estados físicos y la experiencia externa y un aINS hiperreactivo. Del mismo modo, los esfuerzos de comportamiento (por ejemplo, evitación) puede permitir la desconexión de la incómoda respuesta fisiológica (Lowery-Gionta, DiBerto, & Louis, 2018, págs. 1 - 13).

Comportamientos de congelamiento o sobresalto en respuesta a una amenaza inmediata son características del miedo, mientras que la evitación en condiciones impredecibles y de menor amenaza es característica de una respuesta ansiosa (Lowery-Gionta, DiBerto, & Louis, 2018, págs. 1 - 13).

#### ***1.1.4. Tratamientos de la ansiedad***

##### ***Tratamiento farmacológico***

En la actualidad existen tratamientos químicos que son utilizadas para contrarrestar esta patología, dentro de estos grupos farmacológicos podemos encontrar a dos familias:

- Inhibidores selectivos de la recaptura de la serotonina
- Benzodiacepinas

**Benzodiacepinas:** Son medicamentos utilizados para tratar trastornos de ansiedad; principalmente actúan uniéndose a los receptores GABAérgicos y como consecuencia ocasionan una mayor afinidad del neurotransmisor al receptor, con ello se produce una apertura de los canales Cl, y favorecen las respuestas inhibitorias.

**Tabla 1-1** Medicamentos más utilizados en el tratamiento para la ansiedad

Clonazepam	Tratamiento corto de 8 a 12 semanas Se administra de 2 a 3 veces al día.
Alprazolam	
Diazepam	

**Fuente:** (Nacional, 2016, págs. 1 - 15)

**Realizado por:** Pachacama, Sebastián. 2019

**Inhibidores selectivos de la recaptura de la serotonina:** Este tipo de fármaco inhibe los transportadores de recaptación, por lo que la neurotransmisión sináptica aumenta y se prolonga. Cabe recordar que la neurotransmisión dopaminérgica se agota por vía de la 5-HT2.

**Tabla 2-1** Medicamentos de primera elección en el tratamiento para la ansiedad

Paroxetina	Si en el tratamiento no tiene mejorías se debe sustituir por Venlafaxina (evitar en pacientes con arritmias cardíacas) o Imipramina Se administra 1 vez al día
Sertralina	
Escitalopram	

**Fuente:** (Nacional, 2016, págs. 1 - 15)

**Realizado por:** Pachacama, Sebastián. 2019

### ***Tratamiento no farmacológico***

En la actualidad existe una variedad de tratamientos que ayudan a esta patología entre ellos tenemos:

- Psicoterapia

La Psicoterapia es una técnica que ayuda a las personas a encontrar soluciones al problema que tiene; el cual consiste en conversaciones continuas con un profesional de la salud, este tratamiento es conocido como la terapia del habla que junto a un terapeuta ayuda al



descubrimiento personal; sin embargo, antes de iniciar este tratamiento es importante que el paciente acepte su condición (PÉREZ-SÁNCHEZ, PARRA-JIMÉNEZ, & ESPINOSA-PARRA, 2014).

#### **1.1.5. Biodiversidad de Ecuador**

Los mercados tradicionales en el Ecuador y dentro de la región andina son especialmente importantes para el comercio de recursos vegetales entre la población local, incluso antes de la colonización española. Estos espacios estratégicos persisten por el valor cultural de la medicina tradicional reflejado en el significativo consumo de plantas medicinales, tanto en la población rural como urbana (Tinitana, Rios, Romero-Benavides, & Pardo-de-Santayana, 2016, págs. 1- 8).

En la región andina se han realizado varios estudios sobre los mercados tradicionales, en los cuales se enfatiza aspectos etnobotánicos y culturales y se estima que se vende aproximadamente 273 especies de plantas medicinales. En el Ecuador, las ciudades capitales, representadas por Ambato, Quito, Riobamba, Nueva Loja, Puyo y Tena, son los principales puntos de intercambio de plantas medicinales y sus derivados; desde estos lugares, las rutas comerciales comienzan a extenderse por todo el país (Tinitana, Rios, Romero-Benavides, & Pardo-de-Santayana, 2016, págs. 1- 8).

Los usos de las plantas medicinales en el Ecuador están relacionados ampliamente con las prácticas de salud. Los 53 usos terapéuticos registrados se agruparon en 12 categorías médicas que fueron adaptadas de la Organización Mundial de la Salud; de las cuales 57 especies vegetales vendidas fueron para tratar dolencias relacionadas con los sistemas digestivo, dermatológico y sensorial; mientras que 11 especies de plantas medicinales que poseen *Matricaria recutita* y *Gaiadendrum punctatum* son utilizadas para otras dolencias del sistema digestivo y respiratorio (Tinitana, Rios, Romero-Benavides, & Pardo-de-Santayana, 2016, págs. 1- 8).

Las cinco especies de plantas medicinales más vendidas y conocidas fueron *Aerva sanguinolenta*, *Equisetum bogotense*, *Matricaria recutita*, *Oreocallis grandiflora* y *Ruta graveolens*. El comercio de estas cinco plantas está relacionado con el tratamiento de diversas enfermedades en el sistema respiratorio, el sistema genitourinario, el sistema digestivo y los síndromes ligados a la cultura (por ejemplo, "mal de ojo", "mal de aire", "susto" y "calor encerrado"). Es importante destacar que *Matricaria recutita* y *Ruta graveolens* se comercializan y emplean en América del Sur y el Viejo Continente, debido a sus cualidades mágicas y medicinales, se relacionan con la preparación de remedios para el alma y el cuerpo (Tinitana, Rios, Romero-Benavides, & Pardo-de-Santayana, 2016, págs. 1- 8).

En Ecuador encontramos aproximadamente 52 familias y 146 géneros de plantas vasculares, lo que hace que la flora ecuatoriana sea más rica y variada respecto a países vecinos ubicados en la misma región. Las familias más abundantes en especies fueron *Asteraceae* (83) y *Poaceae* (49). Zonas como el superpáramo está dominado por familias que son principalmente herbáceas, como *Cyperaceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae* y *Valerianaceae*, mientras que el subpáramo presenta familias arbustivas como *Melastomataceae*, *Ericaceae* y *Solanaceae*. El páramo presenta un gran número de plantas nativas que reflejan el alto nivel de especiación autóctona (Sklenár & Balslev, 2005, págs. 416 - 433).

#### **1.1.6. Plantas medicinales utilizadas para la ansiedad**

La fitoterapia está diseñada para tranquilizar la salud, es decir, "calmar los nervios"; para esta propuesta, la administración oral de infusiones de plantas es común. En investigaciones realizadas en distintos países de América Latina se recopiló información sobre las plantas utilizadas para el tratamiento de los "nervios" para las cuales existen informes de actividad ansiolítica y / o antidepresiva (Gutiérrez, Chilpa, & Jaime, 2014, págs. 591 - 608).

Los tratamientos para los "nervios" incluyen remedios caseros, como los "tés" herbales (incluidas las infusiones y decocciones), utilizados por la población rural y urbana. Los pacientes, incluso en áreas metropolitanas, pueden combinar las prácticas de medicina tradicional con medicamentos recetados (Gutiérrez, Chilpa, & Jaime, 2014, págs. 591 - 608).

Las infusiones son preparadas con una sola planta, o una mezcla de ellas, por ejemplo, es común encontrar: *Agastache mexicana* (toronjil morado), *Agastache mexicana subsp. xolocotziana* (toronjil blanco), *Dracocephalum moldavica* (toronjil azul o chino), *Cinnamomum sp.* (canela), diferentes especies de flores cítricas (flor de azahar), *Chiranthodendron pentadactylon* (flor de manita), *Ternstroemia sp.* (tila), *Foeniculum vulgare* (hinojo) e *Ipomea stans* (tumbavaquero) (BALAM, s.f), (Gutiérrez, Chilpa, & Jaime, 2014, págs. 591 - 608).

En las investigaciones realizadas dentro de esta Institución Superior, las plantas que poseen actividad ansiolítica son hojas de toronjil (*Melissa officinalis*), flores de lavanda (*Lavandula officinalis*), Romerillo (*Hypericum laricifolium*), Pataconyuyo (*Peperomia peltiger* C. DC), hojas de Maracuyá y Badea (*Passiflora edulis* y *Passiflora quadrangularis*), hojas de Luquin rojo (planta) y taxo (*Passiflora manicata* y *Passiflora tripartita*), hojas y flores de Granadilla (*Passiflora ligularis* y *Passiflora mixta*) (DspaceESPOCH, 2019); de estas especies vegetales, casi el 50% pertenecen a ocho familias: Asteraceae 10.87%, Rutaceae 7.6%, Lamiaceae 6.52%,

Passifloraceae 5.43%, Valerianaceae 4.35%, Rosaceae 3.2%, Theaceae 2.17% y Verbenaceae 1.08% (Gutiérrez, Chilpa, & Jaime, 2014, págs. 591 - 608).

### ***1.1.7. Psidium guajava***

#### ***Descripción de la planta***



**Figura 1-1** Psidium guajava

**Fuente:** Pachacama, Sebastián. 2019

*P. guajava* es un arbusto dicotiledóneo grande, de hoja perenne, generalmente de 3-10 m de altura con muchas ramas. Los tallos están torcidos y la corteza es de color marrón claro a rojizo, delgada, lisa y continuamente descamativa. El sistema de raíces es generalmente superficial y muy extenso, cada uno puede presentar raíces profundas. Las hojas son opuestas y simples; las estípulas están ausentes, pecíolo corto, 3-10 mm de largo; hoja oblonga a elíptica, venas prominentes, glándula punteada. Las flores son blancas con pétalos curvados, 2 o 3 en las axilas de las hojas; son fragantes, con cuatro a seis pétalos y anteras amarillas. El fruto es pequeño de 3 a 6 cm de largo, en forma de pera, de color amarillo rojizo cuando está maduro. El fruto contiene varias semillas pequeñas y consiste en un pericarpio carnoso y una cavidad de semillas con pulpa (Shruthi, AdhikariRoshan, & SajjekhanSunita, 2013, págs. 162 - 168).

#### ***Clasificación Taxonómica***

**Reino:** Plantae

**Orden:** Myrtales

**Familia:** Myrtaceae

**Subfamilia:** Myrtoideae

**Género:** *Psidium*

**Especie:** *Guajava*

**Nombre Científico:** *Psidium guajava*

### ***Hábitat y Distribución***

*Psidium guajava* se localiza en la región Costa y Amazónica, tiene preferencia por los climas cálidos cuya temperatura puede variar entre 20 - 30°C respectivamente. Las mayores producciones de *Psidium guajava* están ubicadas en la zona central de la Amazonía (Alcivar, Muñoz, & Cadena, 2011, págs. 1-62), (BUSTOS, 2013, págs. 1 - 99).

### ***Composición química***

Los resultados del análisis fitoquímico realizados por Akinjogunla mostraron que el extracto de la hoja de *P.guajava* tiene diferentes clases de componentes bioactivos como saponinas, alcaloides, taninos, glucósidos cardíacos, terpenos, flavonoides y esteroides, dichos resultados mostraron que las saponinas, los taninos y los alcaloides están presentes en altas concentraciones, seguidos de terpenos, flavonoides y esteroides, mientras que en pequeña concentración los glucósidos cardíacos (Akinjogunla, Etok, & Oshoma, 2011, págs. 329 - 336), (Shruthi, AdhikariRoshan, & SajjekhanSunita, 2013, págs. 162 - 168).

### ***Usos comunes***

*Psidium guajava* es utilizada para diferentes enfermedades como la anorexia, infecciones bacterianas, forúnculos, trastornos intestinales, bronquitis, catarro, cólera, resfriados, cólicos, convulsiones, tos, disentería, dispepsia, edema, epilepsia, fiebre, gingivitis, hemorroides, picazón, ictericia, náuseas, nefritis, problemas respiratorios, reumatismo, sarna, dolor de garganta, espasmos, problemas neuronales, esguinces, problemas estomacales, hinchazón, tónico, dolor de muelas, úlceras y actúa como antiséptico, astringente y sedante (Shruthi, AdhikariRoshan, & SajjekhanSunita, 2013, págs. 162 - 168).

#### ***1.1.8. Estudios realizados de Psidium guajava***

El uso de *Psidium guajava* ha llevado a los investigadores modernos a estudiar sus extractos, es así que, un estudio que incluyó 17 plantas medicinales sobre los efectos antiproliferativos en el carcinoma epidérmico de la boca humana y las células de leucemia murina usando el ensayo MIT, mostró que la hoja de *Psidium guajava* presentaba actividad antiproliferativa, que fue 4.37 veces más efectiva y potente que la vincristina (J Manosroi, 2006, págs. 114 - 120), (J. V. Kamath, 2008, págs. 8-12).

Así también se demostró que los extractos de corteza y hojas tienen acción tóxica *in vitro* contra numerosas bacterias. La galocatequina aislada del extracto de metanol de la hoja de *Psidium guajava* mostró actividad antimutagénica contra *E. coli*. Los extractos acuosos y clorofórmicos fueron eficaces para activar la mutagenicidad de *Salmonella typhimurium* (Grover IS, págs. 1 - 3) (Matsuo N, 1994, págs. 1027 - 1029), (J. V. Kamath, 2008, págs. 8-12).

Las actividades antimicrobianas de los extractos de hojas de *P. guajava* fueron determinadas por el método de difusión en disco (zona de inhibición) y comparadas con el aceite de árbol de té (TTO), la doxiciclina y clindamicina mostrando resultados promisorios. A su vez, se demostró que el extracto podría ser beneficioso para tratar el acné, especialmente por su actividad antiinflamatoria y a la inhibición frente a *Streptococcus mutans* (J. V. Kamath, 2008, págs. 8-12)

Se realizaron estudios del extracto acuoso de *P. guajava* frente al daño hepático agudo experimental inducido por tetracloruro de carbono, paracetamol y tioacetamida, donde se pudo mostrar que tiene actividad hepatoprotectora, esto fue comparado con los efectos de referencia de un agente hepatoprotector conocido como la silimarina, observando que ambos tienen los mismos resultados (J. V. Kamath, 2008, págs. 8-12)

En un estudio realizado por Ojowale la investigación realizada en el extracto de hoja *P. guajava* en ratas se demostró la actividad hipoglucémica. Estos efectos fueron examinados en ratas normales y en diabéticas (Ojewole, 2005, págs. 689 - 695), (J. V. Kamath, 2008, págs. 8-12).

### ***1.1.9. Modelos animales para el estudio de la ansiedad***

#### ***Modelos Experimentales (Pruebas condicionadas)***

Los modelos experimentales o pruebas condicionadas son test en donde se somete a estímulos no cotidianos para determinar los efectos de la memoria, apetito, entre otras y generalmente son pruebas que requieren un entrenamiento exhaustivo y su ejecución debe ser prolongada (REJÓN-ORANTES, PERDOMO, & ROLDÁN, 2011, págs. 78 - 89).

<b>MODELOS DE RESPUESTA CONDICIONADA</b>
Respuesta emocional condicionada
Supresión condicionada
Evitación pasiva/activa
Prueba de cuatro platos
Test de conflicto de Geller-Seifter y el de Vogel
Condicionamiento de vocalizaciones ultrasónicas
Estimulación eléctrica cerebral
Modelo de Thiébot de retirada de la señal de seguridad
Efecto del reforzamiento parcial sobre la extinción
Potenciación de la respuesta de sobresalto

**Figura 2-1** Modelos de respuesta condicionada  
**Fuente:** (Polanco, Vargas-Irwin, & Góngora, 2011, págs. 141 - 148)

***Modelos no Experimentales (Pruebas no condicionadas)***

Pruebas no condicionadas o no experimentales son aquellas que no requieren de un entrenamiento, por lo que son consideradas menos sensibles y las respuestas son espontáneas, por lo que permite conocer las conductas normales de los roedores (REJÓN-ORANTES, PERDOMO, & ROLDÁN, 2011, págs. 78 - 89).

<b>MODELOS DE RESPUESTA INCONDICIONADA</b>
Campo abierto
Tabla de agujeros
Caja de dos compartimientos blanco-negro
Laberinto elevado en cruz
Interacción social
Supresión de la ingesta inducida por la novedad
Contraste negativo
Conducta defensiva de enterramiento
Holeboard

**Figura 3-1** Modelos de respuesta incondicionada

**Fuente:** (Polanco, Vargas-Irwin, & Góngora, 2011, págs. 141 - 148)

Entre las pruebas más conocidas para evaluar la actividad ansiolítica están:

*Campo Claro Oscuro*

El procedimiento experimental fue descrito por Crawley y Goodwin, la prueba se basa en la innata aversión de los roedores a las zonas bien iluminadas y en el comportamiento exploratorio espontáneo en respuesta a un ambiente de luz. La caja de prueba era de acrílico (46x27x30 cm) y se encontraba dividida en dos compartimientos: el más pequeño era negro y el más grande era blanco e iluminado. Durante la sesión experimental, el ratón se coloca individualmente en el centro de la zona blanca frente a la apertura y se graba en video durante 5 minutos su comportamiento, se analizan parámetros como:

- El tiempo que pasa en el compartimento blanco,
- El número de transiciones entre los dos compartimentos (Pultrini, Galindo, & Costa, 2005, págs. 1720 – 1725).
-

### Campo Abierto

La prueba de campo abierto permite evaluar el comportamiento exploratorio y la actividad general tanto en ratones como en ratas, donde se puede medir tanto la calidad como la cantidad de la actividad. El campo abierto es un recinto, generalmente de forma cuadrada, rectangular o circular con paredes circundantes que evitan el escape. El resultado de interés más básico y común es el "movimiento"; sin embargo, esto puede estar influenciado por el rendimiento motor, el impulso exploratorio, el congelamiento u otro comportamiento relacionado con el miedo, la enfermedad, el ciclo circadiano, entre muchas otras variables.

Parámetros como la distancia recorrida, el tiempo dedicado a la mudanza, la cría y el cambio de actividad a lo largo del experimento son algunas de las medidas que se pueden tabular e informar; resultados como la defecación, el tiempo en el centro y la actividad dentro de los primeros 5 minutos, probablemente evalúen algunos aspectos de la emocionalidad, incluida la ansiedad. La OFT (Open Field test por sus siglas en inglés) también se usa comúnmente como un mecanismo para evaluar los efectos sedantes, tóxicos o estimulantes de los compuestos. Por lo tanto, el campo claro mide una serie de facetas de comportamiento más allá de la simple locomoción. Como tal, la prueba tiene varios usos y se incluye en casi todos los análisis exhaustivos del comportamiento de los roedores (Gould, Dao, & Kovacsics, 2009, págs. 1 - 20).

### Laberinto en cruz elevado

Es una prueba ampliamente utilizada, se basa en la aversión natural de los roedores a las alturas y espacios abiertos, fue desarrollado originalmente por Pellow. El laberinto consiste en dos brazos abiertos y dos brazos cerrados elevados a 50 cm del piso, cada brazo tiene 30 cm de largo y 10 cm de ancho y los brazos cerrados tienen 15 cm de alto. Para empezar la prueba el ratón se coloca en el centro del laberinto frente a uno de los brazos abiertos. Durante los siguientes 10 o 15 minutos, se registrarán el número de entradas en cada brazo y la cantidad de tiempo que pasó en cada brazo. Al final de cada prueba, se retira el ratón y se limpia el laberinto con alcohol al 15% (Peng, Wu, Chen, Chen, & Hsieh, 2005, págs. 2451 – 2462).



## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

La investigación se basó en la evaluación de la actividad ansiolítica del extracto de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*) en ratones (*Mus musculus*) a diversas concentraciones, las cuales fueron: 25 ppm, 100 ppm, 200 ppm y 300 ppm. Se utilizaron tres equipos de tipo exploratorio: laberinto en cruz elevado, campo abierto y cuarto claro-oscuro.

#### 2.1. Lugar de Investigación

La investigación se realizó en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, específicamente en los laboratorios de Productos Naturales, Análisis Instrumental y Bioterio.

#### 2.2. Identificación de la materia vegetal

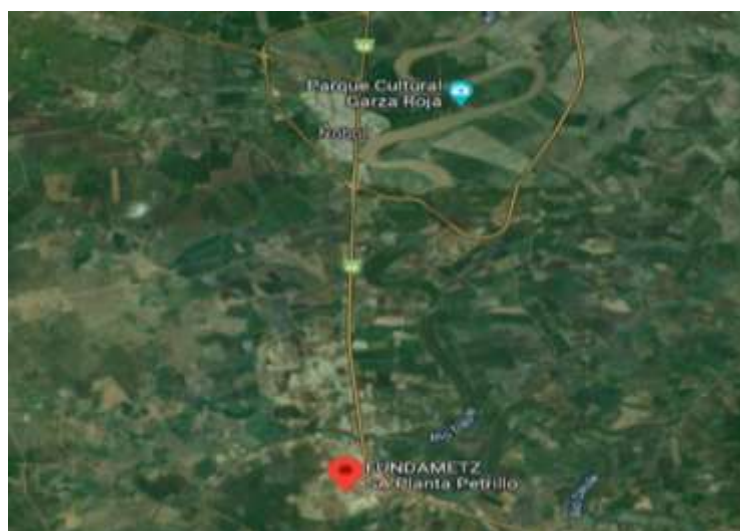
La identificación de *Psidium guajava* se realizó mediante la recolección de la materia vegetal y las muestras fueron identificadas en el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo a cargo del curador Ing. Jorge Caranqui Msc., el cuál remitió el oficio No. 070.CHEP. 2019 validando la identificación de la planta posteriormente estudiada.

#### 2.3. Recolección de la materia vegetal

Las muestras vegetales de *Psidium guajava* fueron recolectadas en la Región Costa, Provincia del Guayas, cantón Nobol. Las coordenadas geográficas que nos brindó el GPS fueron:

- Longitud: W 80° 15' / W 80° 0'
- Latitud: S 2° 0' / S 1° 50'
- Altitud media: 3 m. s. n. m.

Por medio del contrato Marco Nro. MAE-DNB-CM-2018-0086, se permitió la recolección de la muestra vegetal *Psidium guajava*, la cual forma parte de la biodiversidad del Ecuador.



**Figura 1-2** Punto de recolección de *Psidium guajava*.

**Fuente:** Google earth

## 2.4. Materiales, equipos y reactivos

### 2.4.1. *Material vegetal*

- Hojas de guayaba (*Psidium guajava*)

### 2.4.2. *Material biológico*

Para la determinación de la actividad ansiolítica se utilizaron ratones machos (*Mus musculus*) de 2 a 3 meses de edad y con un peso entre 25 a 30 g, los cuales fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Guayaquil. La alimentación suministrada durante el experimento fue *ad libitum*, considerando que no supere los 5 g en cada porción.

### 2.4.3. *Lista de materiales, equipos y reactivos*

**Tabla 1-2** Lista de materiales, equipos y reactivos utilizados durante la investigación.

<b>SECADO Y TRITURADO DE LAS HOJAS DE <i>Psidium guajava</i></b>		
<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Espátula Papel aluminio	Molino Arthur Thomas C.O Estufa Memmert SNB400	
<b>CONTROL DE CALIDAD DE LA MATERIA VEGETAL</b>		
<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Cápsula Crisol de porcelana	Balanza analítica Desecador	Agua destilada Ácido clorhídrico al 10%

Embudo	Estufa Memmert SNB400	Nitrato de plata 0.1 M
Espátula	Mufla IVYMEN N-	
Papel filtro	8LITROS 1100°C	
Pinzas para cápsulas	Sonicador	
Pipeta graduada		
Reverbero		
Trípode		
Vaso de precipitación		
Vidrio reloj		
<b>TAMIZAJE FITOQUÍMICO</b>		
<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Capilar	Sorbona	Agua destilada
Embudo	Cámara UV Chromato-VUE	Alcohol amílico
Espátula		Ácido clorhídrico al 1%
Frasco ámbar		Ácido clorhídrico concentrado
Gradilla		Ácido sulfúrico concentrado
Papel aluminio		Anhídrido sulfúrico concentrado
Papel filtro		Carbonato de sodio
Pera de succión		Cinta de magnesio metálico
Pinza para tubos		Cloruro de sodio
Pipetas graduadas de 1 mL, 5 mL y 10 mL		Cloruro férrico
Probeta de 100 mL		Cloroformo
Reverbero		Etanol
Trípode		Éter etílico
Tubos de ensayo		Hidróxido de sodio al 5%
Vasos de precipitación de 250 mL y 1000 mL		Reactivo de Baljet
		Reactivo de Borntrager
		Reactivo de Catequinas
		Reactivo de Dragendorff
		Reactivo de FeCl <sub>3</sub>
		Reactivo de Fehling A y B
		Reactivo de Mayer
		Reactivo de Sudan III
		Reactivo de Wagner
<b>CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO</b>		
<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Cápsulas de porcelana	Estufa Memmert SNB400	Agua destilada
Picnómetro de 10 mL	pH-metro	Etanol 98%

Pinzas para cápsulas Pizeta Probeta 100 mL Reverbero Vasos de precipitación de 25 mL y 250 mL	Refractómetro	
<b>OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CONCENTRADO</b>		
<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Balón esmerilado 250 mL Espátula Mangueras	Bomba de presión al vacío Congelador Rota vapor BUCHI Sonicador	Agua destilada
<b>CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES Y FLAVONOIDES</b>		
<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Balones de aforo de 25 mL y 100 mL Cronómetro Gradilla Micropipetas Papel aluminio Pera de succión Pipetas de 1 mL, 5 mL y 10 mL Pizeta Puntas amarillas Tubos de ensayo Vasos de precipitación	Balanza analítica Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolución 220 Vórtex mixer MRC S1-100	Agua destilada Ácido gálico Carbonato de sodio al 7.5% Cloruro de aluminio al 10% Etanol Hidróxido de potasio 1 M Nitrito de sodio al 5% Reactivo de Folin-Ciocalteu Quercetina
<b>DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA</b>		
<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Bebederos Cajas de plástico Cánula pequeña Frascos ámbar de 50 mL Jeringuilla de 1mL Rejillas	Balanza analítica Cámara D-LINK Computador	Clonazepam 2.5 mg/mL Extracto 25, 100, 200 y 300 mg/mL Propilenglicol Vaselina

**Realizado por:** Pachacama, Sebastián. 2019

## **2.5. Métodos y técnicas**

### **2.5.1. *Recolección, lavado y secado de la materia vegetal***

Se recolectaron las hojas de guayaba (*Psidium guajava*) considerando las de mejor estado para posteriormente limpiarlas y secarlas en la estufa a una temperatura de 40°C. A continuación, se procedió a la molienda del material vegetal utilizando el molino Arthur Thomas C.O. El material molido fue almacenado en fundas ziploc para protegerlas de la humedad y poderlas conservar por más tiempo.

### **2.5.2. *Parámetros de control de calidad a la planta seca***

#### ***Determinación de humedad***

Se pesó aproximadamente 3 g de la planta seca y triturada y se ubicó en una cápsula de porcelana previamente tarada. Posteriormente se colocó en la estufa por 3 horas a una temperatura de 105°C. Se puso en el desecador y finalmente se pesó.

#### **Expresión:**

$$\%H = \frac{m2 - m1}{m2 - m} \times 100$$

#### **Donde:**

%H= Porcentaje de humedad

m2= peso de la cápsula con la muestra vegetal (g)

m1= peso de la cápsula con la muestra vegetal desecada (g)

m= peso de la cápsula vacía (g)

#### ***Determinación de cenizas totales***

En un crisol previamente tarado se colocó de 2 a 3 g del material vegetal pulverizado y se procedió a carbonizar la muestra con ayuda del reverbero, para posteriormente colocar en la mufla y que se incinere a una temperatura de 700°C por 2 horas. Se colocó el crisol en el desecador para enfriarlo y posteriormente se pesó. Se repite el proceso hasta que el peso fue constante.

#### **Expresión:**

$$\%C = \frac{m_2 - m}{m_1 - m} \times 100$$

**Donde:**

%C= Porcentaje de cenizas totales

m<sub>2</sub>= peso del crisol con la muestra vegetal incinerada (g)

m<sub>1</sub>= peso del crisol con la muestra vegetal (g)

m= peso del crisol vacío (g)

***Determinación de cenizas insolubles en HCl***

Una vez obtenidas las cenizas totales en el primer proceso, se agregó de 2 a 3 mL de HCl al 10% y se tapó el crisol con un vidrio reloj para poder calentarlo a baño maría durante 10 minutos con ayuda del reverbero. Posteriormente, se lavó el vidrio reloj con 5 mL de agua caliente para que el contenido que se encuentra ahí se una a la muestra del crisol. Con la ayuda del papel filtro se filtra el contenido del crisol para la eliminación de cloruros, realizándole varios lavados con agua caliente al filtrado acidulado. El filtrado con el residuo se puso en el crisol para poder carbonizarlo con la ayuda del reverbero y posteriormente paso a la mufla para que su incineración a una temperatura de 700°C por 2 horas. Por último, se colocó el crisol en el desecador para enfriarlo y se pesa. Se repite el proceso hasta que el peso sea constante.

**Expresión:**

$$\%B = \frac{m_2 - m}{m_1 - m} \times 100$$

**Donde:**

%B= Porcentaje de cenizas insolubles en HCl

m<sub>2</sub>= peso del crisol con las cenizas insolubles en HCl (g)

m<sub>1</sub>= peso del crisol con la muestra vegetal (g)

m= peso del crisol vacío (g)

***Determinación de cenizas solubles en agua***

Una vez obtenidas las cenizas totales en el primer proceso, se agregó de 15 a 20 mL de agua destilada y se tapó el crisol con un vidrio reloj para poder calentarlo a baño maría durante 5 minutos en el reverbero. Con la ayuda del papel filtro se filtra el contenido del crisol y

posteriormente el filtrado con el residuo se puso en el crisol para poder carbonizarlo y finalmente colocarlo en la mufla para que se incinere a una temperatura de 700°C por 2 horas. Por último, se coloca el crisol en el desecador para enfriarlo y se pesa. Se repite el proceso hasta que el peso sea constante.

**Expresión:**

$$\%Ca = \frac{m2 - ma}{m1 - m} \times 100$$

**Donde:**

%Ca= porcentaje de cenizas solubles en agua

m2= peso del crisol con las cenizas totales (incineradas) (g)

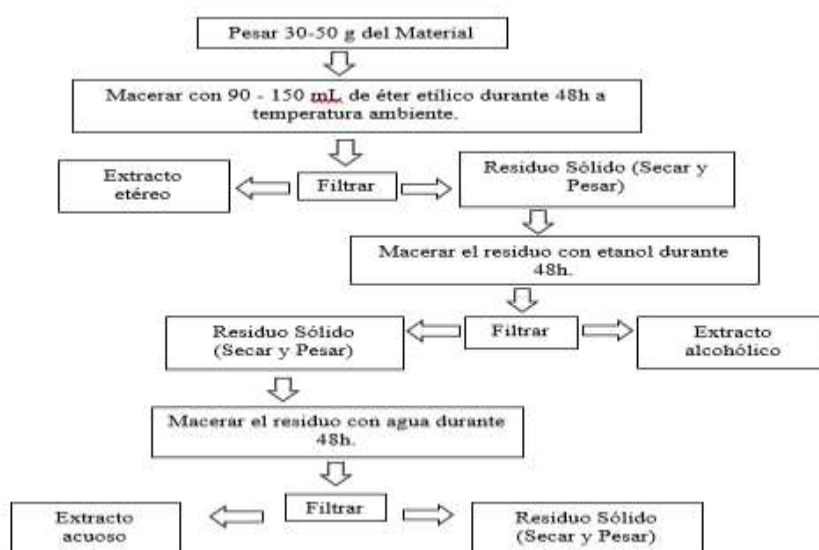
ma= peso del crisol con las cenizas solubles en agua (g)

m1= peso del crisol con la muestra vegetal (g)

m= peso del crisol vacío (g)

**2.5.3. Tamizaje o screening fitoquímico**

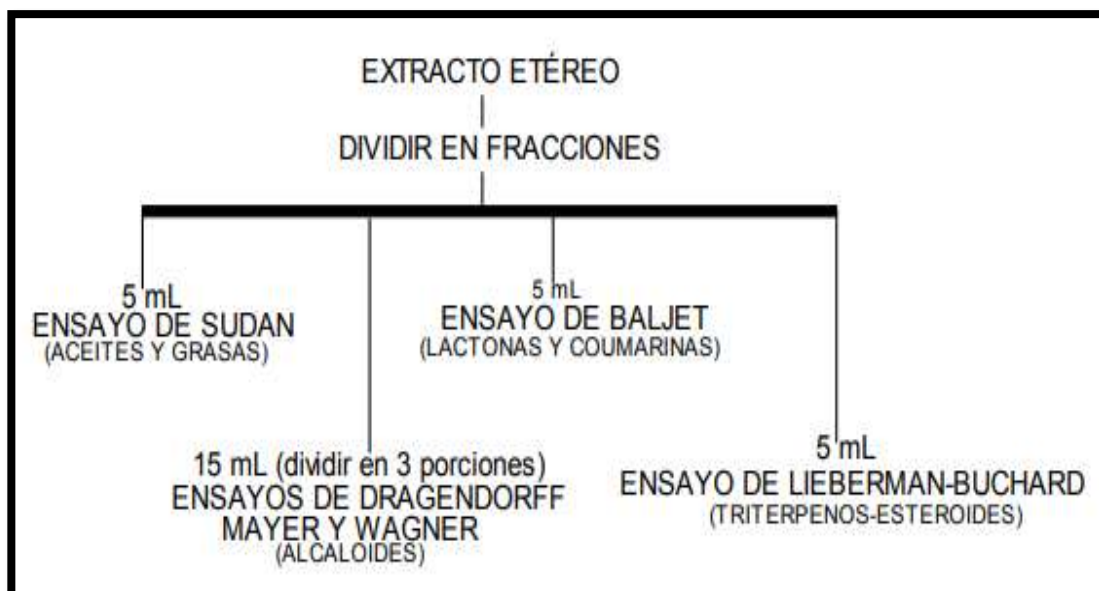
El tamizaje o screening fitoquímico es una técnica que se utiliza para extraer los metabolitos secundarios de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reactivos que nos brinden reacciones de coloración y precipitación. Esta es una de las primeras etapas para la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos que se encuentran en la planta estudiada (UNID, 2016).



**Figura 2-2** Esquema para el Tamizaje Fitoquímico.

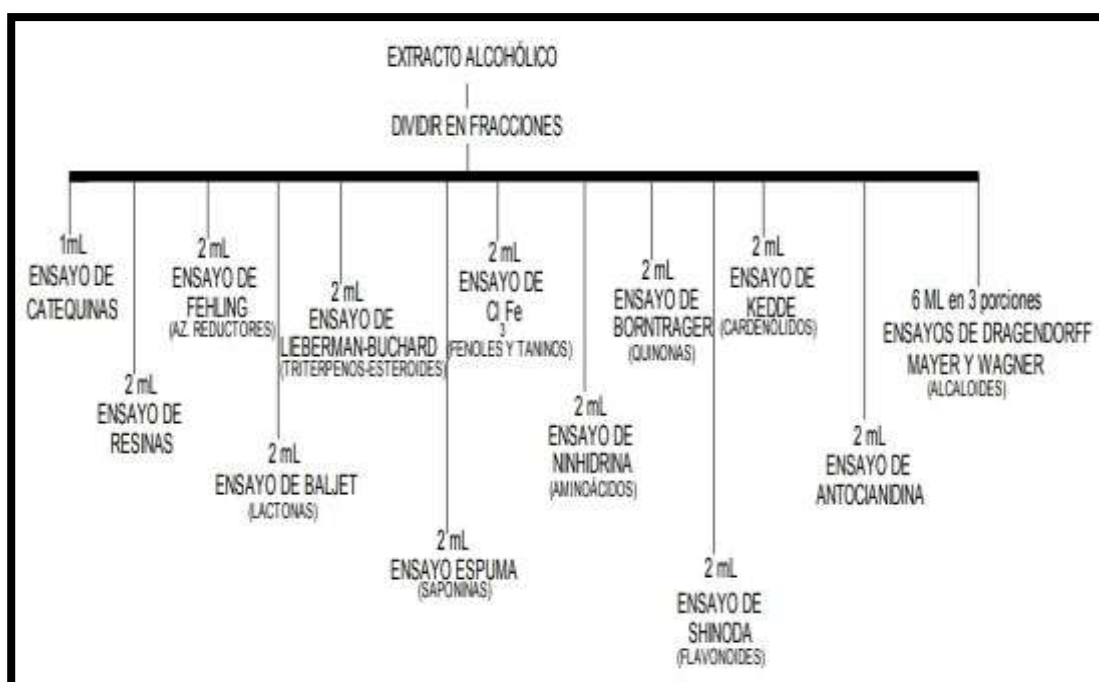
Fuente: Miranda M., 2006

Una vez obtenidos los extractos mediante el esquema de la figura 3-2, se procede a efectuar los ensayos para cada solvente y poder determinar los metabolitos secundarios que posee. A continuación, se especifica los ensayos que se realizó.



**Figura 3-2** Esquema de los ensayos para el extracto etéreo.

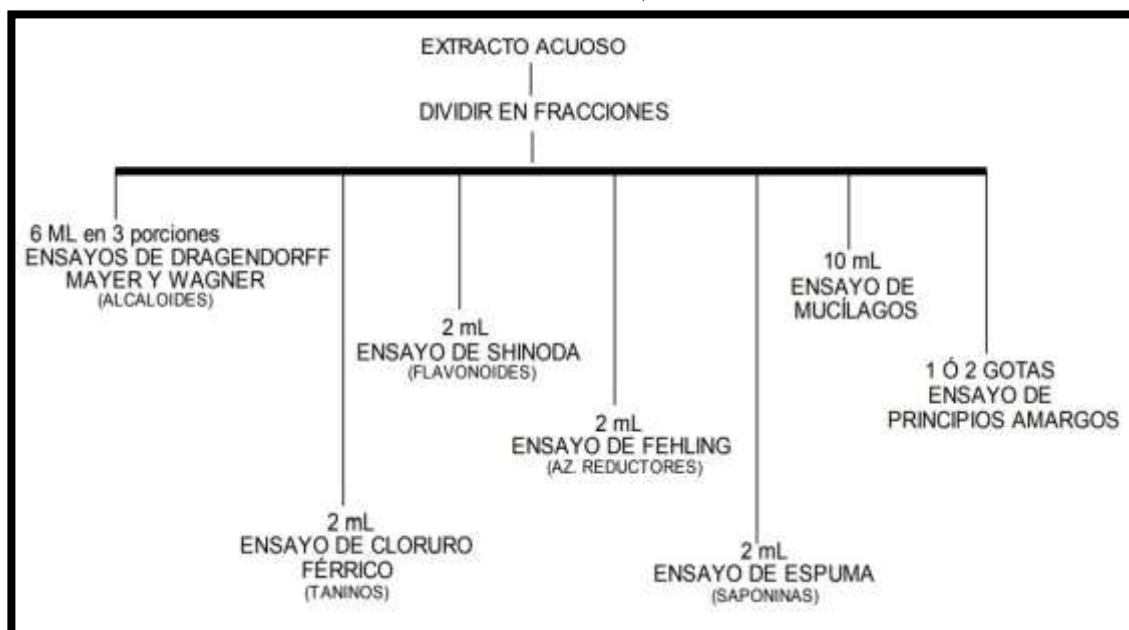
Fuente: Miranda M., 2006





**Figura 4-2** Esquema de los ensayos para el extracto alcohólico.

Fuente: Miranda M., 2006



**Figura 5-2** Esquema de los ensayos para el extracto acuoso.

Fuente: Miranda M., 2006

#### **2.5.4. Preparación del extracto hidroalcohólico de las hojas de GUAYABA (*Psidium guajava*)**

Para preparar el extracto hidroalcohólico, se comenzó pesando 50 g de la droga vegetal de *Psidium guajava* para posteriormente colocarlo en un frasco ámbar el cual contenía 500 mL de etanol al 70% y se lo dejó macerar. Después de la maceración por 3 días se colocó el frasco en el sonicador por un lapso de tiempo de 15 minutos y a continuación se filtró. Finalmente, se concentró en el rotavapor para la evaporación del alcohol.

#### **2.5.5. Control de calidad del extracto hidroalcohólico**

##### **Requisitos organolépticos**

Para el análisis organoléptico se utilizaron los sentidos de la visión, gusto y olfato, con lo cual se pudo precisar el color, aspecto, sabor y olor. Este análisis ayuda a garantizar la calidad del extracto a utilizar posteriormente en los ensayos.

### ***Índice de refracción***

Para esta prueba se utilizó un refractómetro anticipadamente calibrado donde se colocó una gota de la muestra sobre el prisma y finalmente se enfocó la luz por medio del espejo para poder realizar la lectura y obtener el valor final.

### ***Determinación de pH***

Para obtener este valor se utilizó un pHmetro digital, en el cual se colocó un poco del extracto hidroalcohólico en un vaso de precipitación y se introdujo el electrodo para la medición.

### ***Densidad relativa***

Para esta prueba se utilizó un picnómetro, el cual fue pesado para obtener así el valor del picnómetro seco y vacío. Después se llenó el picnómetro con agua destilada a 25°C y se procedió a pesar. Se repitió el proceso, pero ahora llenando el picnómetro con el extracto hidroalcohólico y dejándolo reposar por 15 minutos a 25°C. Para obtener el valor final se calculó con la siguiente fórmula:

$$D = \frac{m1 - m}{m2 - m}$$

#### **Donde:**

D= densidad relativa (g/mL)

m= valor del picnómetro vacío

m1= valor del picnómetro con el extracto hidroalcohólico

m2= valor del picnómetro con agua destilada

### ***Sólidos totales***

Primero se taró una cápsula a 105°C, después se colocó 5 mL del extracto hidroalcohólico y se dejó evaporar a baño maría. Posteriormente se colocó la cápsula en la estufa por 3 horas a una temperatura de 105°C. Finalmente se coloca la cápsula en el desecador para que se enfríe y alcance la temperatura ambiente y de ahí pesarla. Para obtener el valor final se calculó con la siguiente fórmula:

$$ST = \frac{Pr - P}{V} \times 100$$

Donde:

ST= sólidos totales en la muestra (%)

Pr= peso de la cápsula con el residuo (g)

P= peso de la cápsula tarada y vacía (g)

V= volumen de la alícuota del ensayo (mL)

#### **2.5.6. Determinación de fenoles totales**

Para el ensayo de fenoles totales se tomaron alícuotas de la muestra y de las distintas soluciones estándar de ácido gálico; después se procedió a poner 0.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu al 20%; se espera por 5 minutos y una vez transcurrido este tiempo se añade 0.5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% y 5 mL de agua destilada; a continuación, se dejó reposar la mezcla por 2 horas a temperatura ambiente y cuidándole de la luz. Por último, se realizó las lecturas de las absorbancias en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm.

#### **2.5.7. Determinación de flavonoides totales**

Para el ensayo de flavonoides totales se tomó una alícuota de la muestra y de la solución estándar de quercetina; se añadió 0.3 mL de Nitrato de sodio al 5% y 4 mL de agua destilada; se esperó por 6 minutos y una vez transcurrido este tiempo se colocó 2 mL de Hidróxido de sodio 1 M. Por último, se dejó reposar y se realizó las lecturas de las absorbancias en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm.

#### **2.5.8. Actividad ansiolítica**

Para la determinación de la actividad ansiolítica se empleó ratones machos de la especie *Mus musculus*, los cuales poseían características especiales como edad entre 2 a 3 meses aproximadamente y un peso de 25 a 30 g, de manera que si no se encontraban en este rango de peso se les proporcionaba una dieta hasta lograr alcanzar el peso requerido. Los biomodelos fueron adquiridos en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública “Dr. Leopoldo Pérez” (INSPI), ubicado en la ciudad de Guayaquil.

La determinación de la actividad ansiolítica se efectuó en las instalaciones de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, específicamente en el Bioterio de la Facultad de Ciencias, el cual presenta todas las condiciones necesarias para la adaptación de los biomodelos. Las condiciones macro-ambientales que se brindó a los ratones antes y durante la experimentación fueron: temperatura de 21 a 23°C, iluminación controlada (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad), ventilación y ambiente libre de ruidos que provengan del exterior del Bioterio. Los

biomodelos fueron pesados, agrupados y colocados en diferentes cajas plásticas las cuales contaban con sus respectivas rejillas, tamo esterilizado, bebedero con agua clorada y comida balanceada.

En la tabla 2-2 se especifica la distribución de los biomodelos y las concentraciones administradas. Para la administración del extracto concentrado de *Psidium guajava*, primero se lo reconstituyó con propilenglicol al 15%. Previamente a la administración del tratamiento, los biomodelos fueron sometidos a situaciones de estrés mediante la manipulación, inmovilización y colocándolos en cajas con ratones de otros grupos, posteriormente se les administró 0.5 mL de extracto a cada ratón de acuerdo con las concentraciones o tratamiento establecido; a continuación, se esperó 30 minutos antes de colocar al ratón en la prueba para la determinación de la actividad ansiolítica.

**Tabla 2-2** Grupos y tratamientos para la evaluación de la actividad ansiolítica de las hojas de *Psidium guajava*

	<b>Número de ratones</b>	<b>Código</b>	<b>Concentración</b>
	5	Control -	
<b>Clonazepam</b>	5	Control +	0.5 mg/kg
<i>Psidium guajava</i>	5	D1-PG	25 mg/kg
	5	D2-PG	100 mg/kg
	5	D3-PG	200 mg/kg
	5	D4-PG	300 mg/kg

**Realizado por:** Pachacama, Sebastián. 2020

Para la determinación de la actividad ansiolítica se utilizaron pruebas no condicionadas, entre las cuales se encuentra: cuarto claro-oscuro, laberinto cruz-elevado y campo abierto; estas pruebas permiten observar la conducta de los ratones en cada equipo. Por medio de programas como ITOPI (cuarto claro-oscuro y laberinto cruz-elevado) y EMIS (campo abierto) se obtuvo los resultados.

#### ***Equipo electrónico de medición Cuarto Claro-Oscuro***

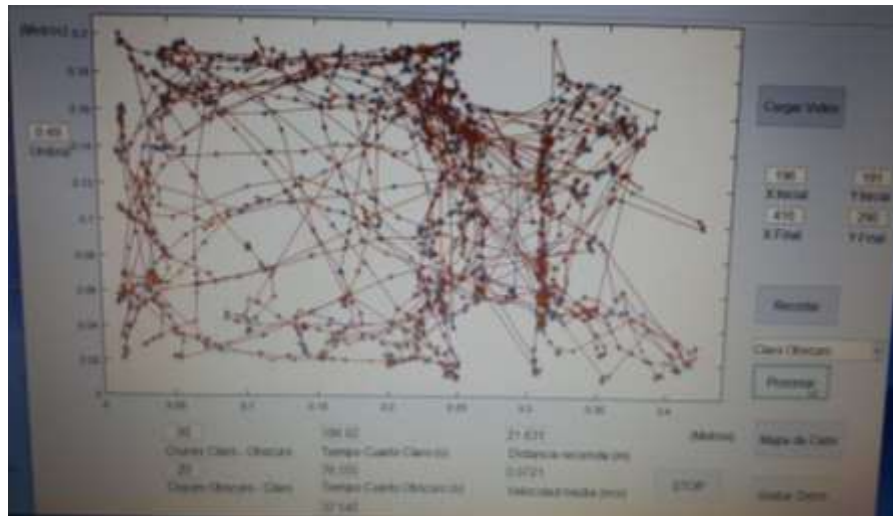
Este equipo de medición consiste en una caja acrílica compuesta de dos partes, una parte clara que posee una dimensión de 29 x 21 cm y la parte oscura con una dimensión de 15 x 21 cm; las dos partes poseen una altura de 21 cm. Posee una pared acrílica de color negro que separa la parte clara de la oscura y esta tiene una abertura (15 x 3 cm) que permite el paso del biomodelo de un lado a otro (David Moreno, 2018, p. 32).

La caja acrílica se encuentra dentro de una estructura metálica que está recubierta por una cortina de color café la cual cumple la función de impedir el paso de luz hacia la caja. En el techo de la estructura se encuentra una cámara D-link la cual permitió grabar en video todos los movimientos del ratón en la caja.



**Figura 6-2** Equipo de medición “Cuarto claro-oscuro”  
Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

Los videos del equipo cuarto claro-oscuro fueron procesados en el software ITOPI el cual brinda los resultados que sirven para realizar el análisis estadístico.



**Figura 7-2** Programa ITOPI del “Cuarto claro-oscuro”

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

**Tabla 3-2** Criterios de medición en el Cuarto claro-oscuro

Número de entradas del cuarto claro al oscuro	Mayor número de entradas = mejor locomoción.
Número de entradas del cuarto oscuro al claro	Mayor número de entradas = mejor locomoción.
Tiempo de estancia en el cuarto claro (s)	El ratón se encuentra relajado y explora lugares iluminados.
Tiempo de estancia en el cuarto oscuro (s)	El ratón se encuentra estresado y permanece en lugares sin luz.
Distancia recorrida (m)	Mayor trayectoria = mejor actividad locomotora.
Velocidad media (m/s)	Mayor desplazamiento = mejor actividad locomotora.

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

### ***Equipo electrónico de medición Laberinto en Cruz Elevado***

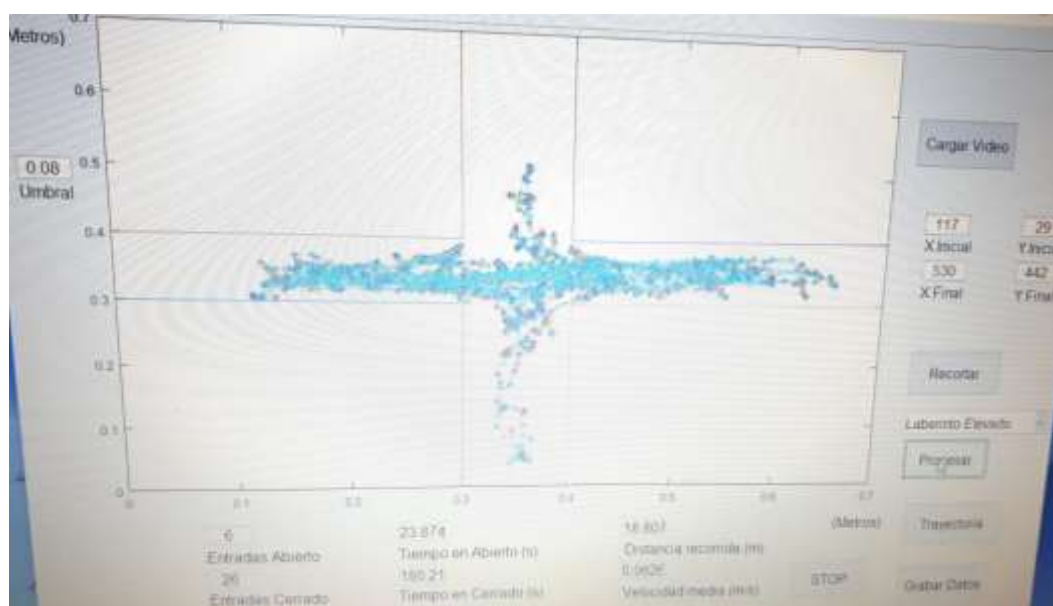
Este equipo de medición se trata de una estructura acrílica de color negro que consta de cuatro brazos; dos brazos denominados abiertos que cuentan con una dimensión de 30 x 10 cm y dos brazos cerrados de igual dimensión de 30 x 10 cm, pero además esta parte posee paredes de 20 cm de altura. Esta estructura acrílica está conectada a un soporte de 38 cm a nivel del suelo (David Moreno, 2018, p. 30).

El Laberinto Cruz-Elevado se encuentra dentro de una estructura metálica que está recubierta por una cortina de color café la cual cumple la función de impedir el paso de luz hacia el laberinto. En el techo de la estructura se encuentra una cámara D-link la cual permite grabar en video todos los movimientos del ratón en el equipo.



**Figura 8-2** Equipo de medición “Laberinto en Cruz Elevado”  
Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

Los videos del equipo Laberinto en Cruz Elevado fueron procesados en el software ITOPI el cual brinda los resultados que se emplean para realizar el análisis estadístico.



**Figura 9-2** Programa ITOPI del “Laberinto en Cruz Elevado”

**Realizado por:** Pachacama, Sebastián. 2020

**Tabla 4-2** Criterios de medición en el Laberinto en Cruz Elevado

Número de entradas brazos abiertos	Mayor número de entradas = mejor locomoción.
Número de entradas brazos cerrados	Mayor número de entradas = mejor locomoción.
Número de entradas a la mitad	Mayor número de entradas = mejor locomoción.
Tiempo de permanencia en los brazos abiertos	Una mayor estadía en esta zona significa que el ratón se encuentra relajado
Tiempo de permanencia en los brazos cerrado	Una mayor estadía en esta zona significa que el ratón se encuentra estresado.
Tiempo de permanencia en el centro	El ratón quiere examinar otras zonas.
Distancia recorrida	Mayor trayectoria = mejor actividad locomotora.
Velocidad media	Mayor desplazamiento = mejor actividad locomotora.

**Realizado por:** Pachacama, Sebastián. 2020

***Equipo electrónico de medición Campo Abierto***

Este equipo de medición se trata de una caja acrílica de forma cuadrada, cuyas dimensiones son de 68 x 68 cm y sus paredes tienen una altura de 45 cm (GODOY, 2018, p. 49).

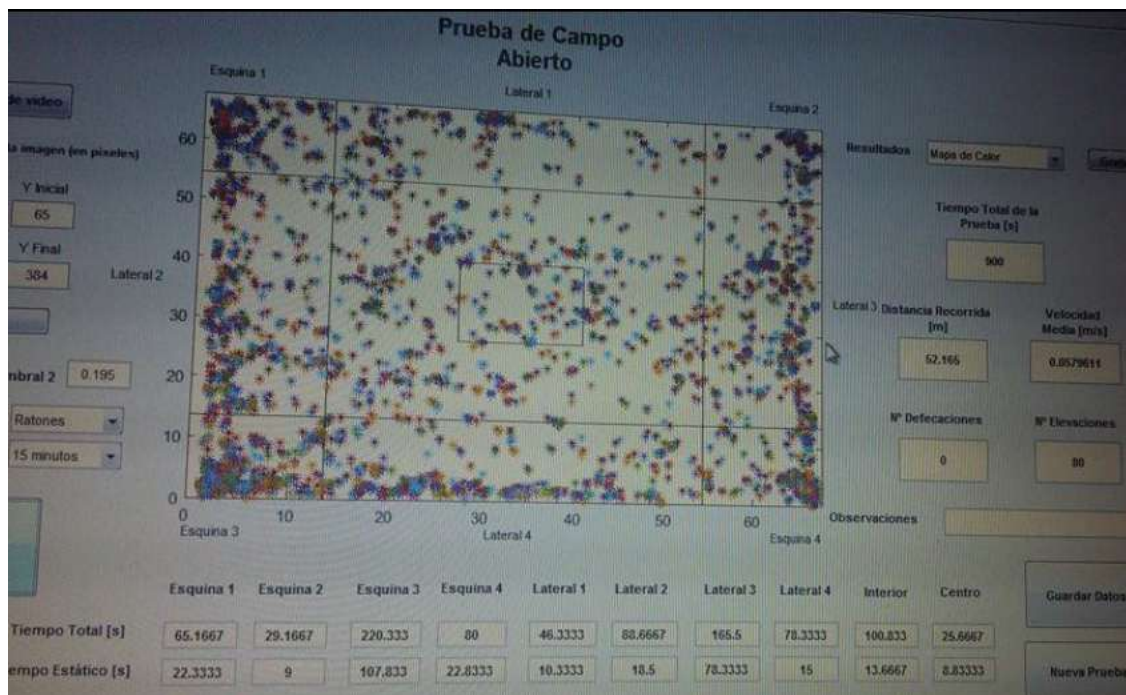


La caja acrílica se encuentra dentro de una estructura metálica que está recubierta por una cortina de color café la cual cumple la función de impedir el paso de luz hacia la caja. En el techo de la estructura se encuentra una cámara D-link la cual permite grabar en video todos los movimientos del ratón.



**Figura 10-2** Equipo de medición “Campo abierto”  
Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

Los videos del equipo Campo abierto fueron procesados en el software EMIS el cual brinda los resultados que se emplean para realizar el análisis estadístico.



**Figura 11-2** Equipo de medición “Campo abierto”

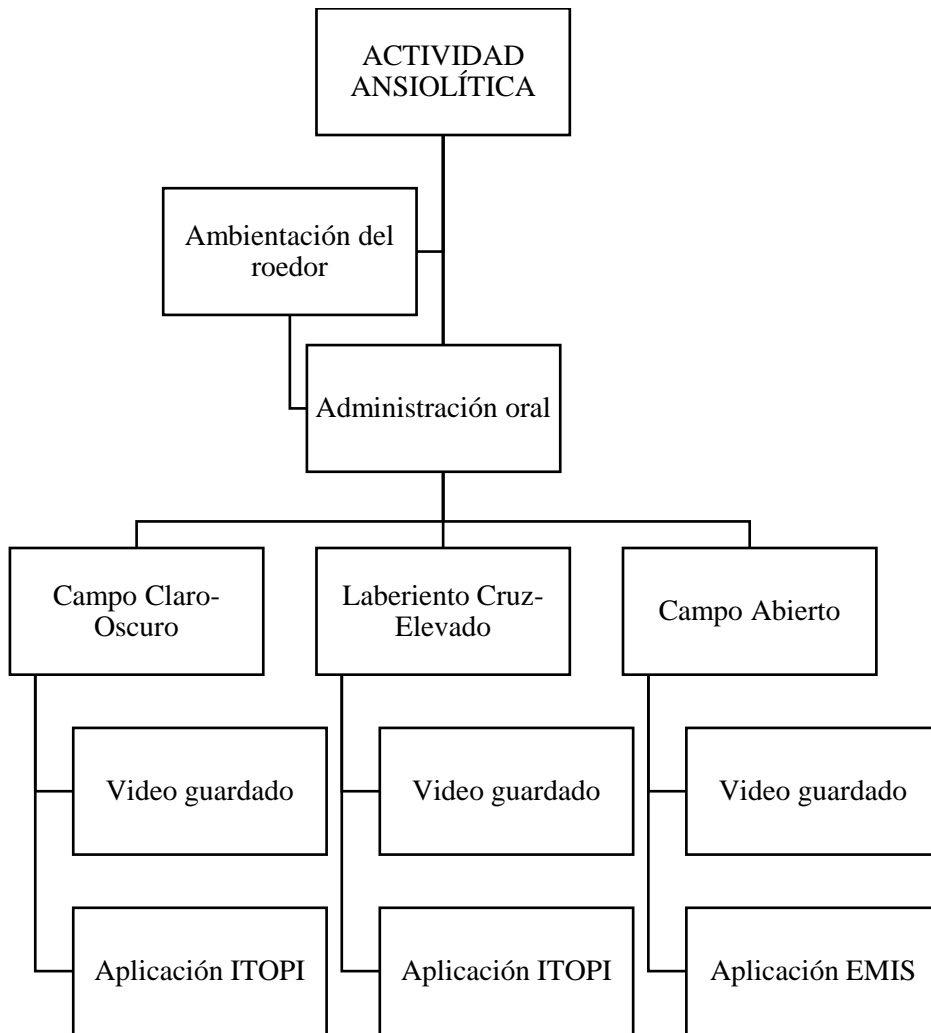
Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

**Tabla 5-2** Criterios de medición en el Campo Abierto

Distancia recorrida	Mayor trayectoria = actividad locomotora no alterada.
Velocidad media	Mayor desplazamiento = buena actividad locomotora.
Número de defecaciones	Más defecaciones = roedor estresado.
Número de elevaciones	Más elevaciones = roedor estresado.
Tiempo en esquinas	Mayor tiempo en las esquinas = roedor estresado.
Tiempo en laterales	Mayor tiempo en los laterales = roedor estresado.
Tiempo en el interior	Mayor tiempo en el interior = roedor relajado y busca lugares con luz por el centro.
Tiempo en el centro	Mayor tiempo en el centro = roedor relajado y busca nuevos ambientes.

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

*Procedimiento de la utilización de los equipos*



**Figura 12-2** Flujograma para determinar la actividad ansiolítica

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

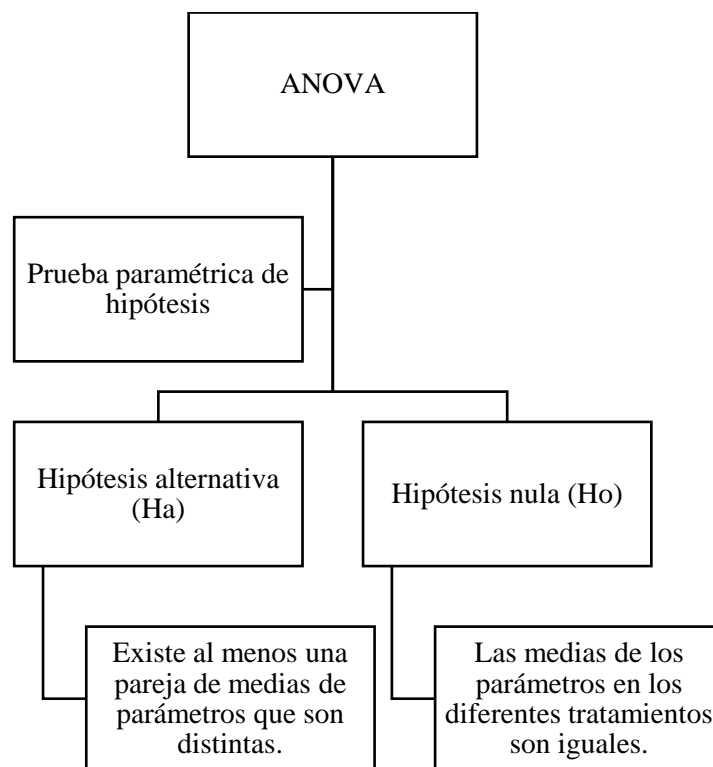
Para el manejo adecuado de los equipos se consideró los POES; estos documentos especifican la correcta utilización para cada equipo. Se empezó armando y desinfectando el equipo, se utilizó etanol al 10%. Posteriormente se adaptó la cámara al equipo y se la encendió para poder establecer una conexión entre la computadora y la cámara. Después se colocó un ratón a la vez en los equipos durante el tiempo requerido en cada tratamiento para determinar la actividad ansiolítica. Una vez acabada la prueba, se retiró al ratón para desinfectar el equipo y guardar la grabación.

Por último, los videos obtenidos fueron procesados en los programas ITOPI y EMIS, los datos arrojados se guardaron en Excel para analizarlos.

### 2.5.9. Análisis estadístico

Los datos guardados en Excel fueron analizados en el programa IBM® SPSS® statistics versión 22, donde se verificó que cumplan con los parámetros estadísticos por medio de pruebas de homogeneidad de varianzas y normalidad. Para verificar la normalidad (distribución normal) de los datos se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk.

Posteriormente, se procedió de la siguiente forma:



**Figura 13-2** Flujograma para determinar ANOVA

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

Si en el test ANOVA se obtienen resultados menores que el nivel de significancia ( $< 0,01$ ), esto indica que al menos una pareja de medias es distinta. Para determinar que pareja de medias son distintas se aplicó el test post hoc Tukey.

El test post hoc Tukey, principalmente se utiliza para comprobar si la relación entre dos conjuntos de datos es estadísticamente significativa, la cual ayuda a la toma de decisión más confiable.

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

#### 3.1. Resultados de control de calidad de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*)

Tabla 1-3 Resultados obtenidos del control de calidad de droga cruda de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*)

PARÁMETRO	Hojas de Guayaba ( <i>Psidium guajava</i> )	Límites de referencia	Normativa
Humedad (%)	4,77±0,008	Hasta 14%	USP# 35
Cenizas totales (%)	8,51±0,01	Hasta 12%	USP# 35
Cenizas solubles en agua (%)	2,27±0,03	Hasta 7%	USP# 35
Cenizas insolubles en HCl (%)	1,88±0,02	Hasta 5%	USP# 35

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

En la Tabla 1-3 se puede visualizar que los resultados obtenidos en cuanto a la humedad de las hojas de Guayaba (*Psidium guajava*), están dentro de los rangos permitidos según USP 35. El valor de 4,77% de humedad ayuda a evitar la proliferación microbiana.

La determinación de cenizas totales se realizó por el método gravimétrico, en la tabla 1-3 se puede visualizar que las cenizas totales tienen un valor de 8,51% y las solubles en agua de 2,27%, siendo valores normales según los parámetros establecidos por la USP 35, estos resultados determinan la presencia de minerales en la *Psidium guajava*, mientras que los valores de ceniza insolubles en HCl 10% tiene un valor de 1,88%, el mismo que está dentro de los valores establecidos por la USP 35, este valor es un indicativo de la presencia de sílica y arena en la droga vegetal.

### 3.2. Resultados del Tamizaje Fitoquímico

**Tabla 2-3** Resultados del Tamizaje fitoquímico de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*)

TIPO DE ENSAYO	COMPUESTO IDENTIFICADO	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
<b>SUDÁN</b>	Grasas	+	N/A	N/A
<b>BALJET</b>	Lactonas y cumarinas	++	++	N/A
<b>DRAGENDORFF</b>	Alcaloides	+++	++	++
<b>MAYER</b>	Alcaloides	+	+	+
<b>WAGNER</b>	Alcaloides	+++	+++	+++
<b>LIBERMANN BOUCHARD</b>	Triterpenos y esteroides	+	+	N/A
<b>CATEQUINAS</b>	Catequinas	N/A	+	N/A
<b>RESINAS</b>	Resinas	N/A	-	N/A
<b>FEHLING</b>	Azúcares	N/A	++	++
<b>CLORURO FÉRRICO</b>	Compuestos fenólicos	N/A	+++	++
<b>ESPUMA</b>	Saponinas	N/A	-	-
<b>BORNTRAGER</b>	Quinonas	N/A	+++	N/A
<b>SHINODA</b>	Flavonoides	N/A	++	+++
<b>ANTOCIANIDINAS</b>	Secuencias de grupos de flavonoides	N/A	++	N/A
<b>MUCÍLAGOS</b>	Polisacáridos	N/A	N/A	+
<b>PRINCIPIOS AMARGOS Y ASTRINGENTES</b>		N/A	N/A	Amargo

N/A= no aplica, + = presencia, - = ausencia

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

En la Tabla 2-3 se puede apreciar los ensayos realizados para en el estudio fitoquímico de las hojas de *Psidium guajava*, se siguió un orden según la polaridad de los solventes para determinar la presencia de metabolitos secundarios en la planta. Se conoce que los metabolitos secundarios son causantes de las propiedades medicinales que poseen las especies vegetales, los cuales son utilizados desde la antigüedad.

Se identificó la presencia de: lactonas, alcaloides, azúcares, compuestos fenólicos, quinonas y flavonoides; en menor concentración grasas, triterpenos y esteroides, catequinas y mucílagos.

Los alcaloides tienen propiedades farmacológicas definidas y científicamente han sido verificadas; los compuestos de este tipo generalmente son purificados y comercializados como productos químicos finos (Murphy, 2017). Se conoce que la mayoría de los alcaloides son biológicamente activos o venenosos en dosis altas, sin embargo, existen algunos alcaloides en los alimentos que a menudo se consumen a diario como la cafeína, el té, entre otros que presentan actividad estimulante o inhibitoria del SNC (Memariani, Gorji, & Farzaei, 2020, págs. 23-66).

Las quinonas son metabolitos secundarios aislados principalmente de plantas y que tienen un sistema di-cetona aromático (saturado hexacíclico); este tipo de compuestos generalmente se derivan de la oxidación de las hidroquinonas. Las quinonas naturales están ampliamente distribuidas e incluyen benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas y poliquinonas; las mismas que exhiben numerosas actividades biológicas tales como neurológicas, antibacterianas, antipalúdicas, antioxidantes, tripanocidas, antitumorales y anti-VIH, y se ha demostrado que estas actividades están relacionadas con las propiedades redox de sus funciones carbonilo (Eyong, Victor, & Thomas, 2013, págs. 351 - 391).

En relación a las lactonas se puede decir que existe evidencia que pueden colaborar con efectos ansiolíticos y sedantes a través de modulación positiva de la función del receptor GABA-A que actúa en sitios diferentes de unión de la benzodiazepina clásica; varios estudios funcionales de los receptores recombinantes  $\alpha 1\beta 2 \gamma 2L$  GABA-A han demostrado que las lactonas actúan como moduladores positivos, pero dichas investigaciones deben extenderse para determinar las diferentes combinaciones de subunidades (Johnston, y otros, 2009, págs. 1095-1101).

Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y son los metabolitos secundarios más abundantes de las plantas; tienen potentes propiedades antioxidantes y marcados efectos en la prevención de diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo (Mumper, págs. 7313-7352).

Los flavonoides son metabolitos secundarios estructuralmente diversos en las plantas, con una multitud de funciones, desde la regulación del desarrollo de plantas, pigmentación y protección UV, hasta una variedad de roles en defensa y señalización entre plantas y microorganismos. Debido a su prevalencia en la dieta humana, muchos flavonoides constituyen componentes importantes de las plantas medicinales y se utilizan en el control de la inflamación y la prevención del cáncer (Mathesius, 2018, pág. 30).

### 3.3. Resultado del control de calidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de GUAYABA (*Psidium guajava*)

**Tabla 3-3** Resultados del control de calidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de GUAYABA (*Psidium guajava*)

Parámetro	Extracto hidroalcohólico de las hojas de GUAYABA ( <i>Psidium guajava</i> )
<b>CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS</b>	
<b>Olor</b>	Agradable – fuerte
<b>Color</b>	Verde oscuro
<b>Aspecto</b>	Ligeramente turbio
<b>Sabor</b>	Amargo
<b>CARACTERÍSTICAS FÍSICO – QUÍMICAS</b>	
<b>Índice de refracción</b>	1,3658
<b>pH</b>	5,40
<b>Densidad relativa</b>	0,927 g/MI
<b>Sólidos totales (%)</b>	1,44

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

En la tabla 3-3 se puede observar las características organolépticas del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Psidium guajava* que a través de los sentidos se determinó las características propias del extracto y algunas debido al solvente que se utilizó.

En referencia a las características fisicoquímicas son ensayos que se realiza para determinar la calidad del extracto.

El pH del extracto fue de 5,40 considerándose ligeramente ácido, esto se debe a la presencia de metabolitos secundarios encontrados como los flavonoides, alcaloides, fenoles.

El valor del índice de refracción es de 1,365 que indica la cantidad de metabolitos extraídos con el solvente que se utilizó.



En relación a la densidad relativa se obtuvo el valor de 0,927 g/ml, al ser comparado con el agua cuyo valor es de 1 g/ml, el extracto presenta menor cantidad, esto se debe a la presencia de compuestos disueltos, pero también puede darse por condiciones de conservación.

La presencia de sólidos totales es de 1,44%, este valor representa la presencia de materia orgánica y metabolitos secundarios en el extracto.

### 3.4. Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu

**Tabla 4-3** Resultados de la cantidad de fenoles totales de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*)

<b>Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>P. guajava</i></b>	<b>Fenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto seco</b>	<b>Porcentaje</b>
100 ppm en etanol al 70%	304,67 ± 7,64	30,47 ± 0,76

**Realizado por:** Pachacama, Sebastián. 2020

En la Tabla 4-3 se puede observar la cantidad de fenoles totales que se obtuvo del extracto hidroalcohólico de las hojas de *P. guajava* a 100 ppm, considerando que el valor que se obtuvo es de 304,67 mg de ácido gálico equivalente por gramo de extracto seco. En la investigación que se realizó en el año 2018 realizada por Akila se establece el contenido fenólico de la hoja de *Psidium guajava* fresca con una cantidad de 99,25 mg de ácido gálico equivalente/ g (Akila, R, & R, 2018). A su vez se conoce que el contenido de fenol es responsable de la actividad antioxidante. Los valores obtenidos en la presente investigación y comparados con los de Akila, pueden variar por diferentes aspectos como: época de recolección, condiciones atmosféricas, ubicación de la planta etc.

### 3.5. Cuantificación de flavonoides totales por colorimetría

**Tabla 5-3** Resultados de la cantidad de flavonoides totales de las hojas de GUAYABA (*Psidium guajava*)

<b>Extracto hidroalcohólico seco de las hojas de <i>P. guajava</i></b>	<b>Flavonoides totales expresados como mg equivalentes de quercetina por g de extracto seco</b>	<b>Porcentaje</b>

100 ppm en etanol al 70%	86,32 ± 7,53	8,63 ± 0,75
--------------------------	--------------	-------------

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

En la Tabla 5-3 se puede observar la cantidad de flavonoides totales obtenidos a 100 ppm del extracto hidroalcohólico. El valor obtenido fue de 86,32 mg equivalentes de quercetina por g de extracto seco: según (Akila, R, & R, 2018), los compuestos totales de flavonoides fueron de 13,292 mg de equivalente de quercetina por gramo de la hoja de *Psidium guajava* fresca.

### 3.6. Actividad ansiolítica

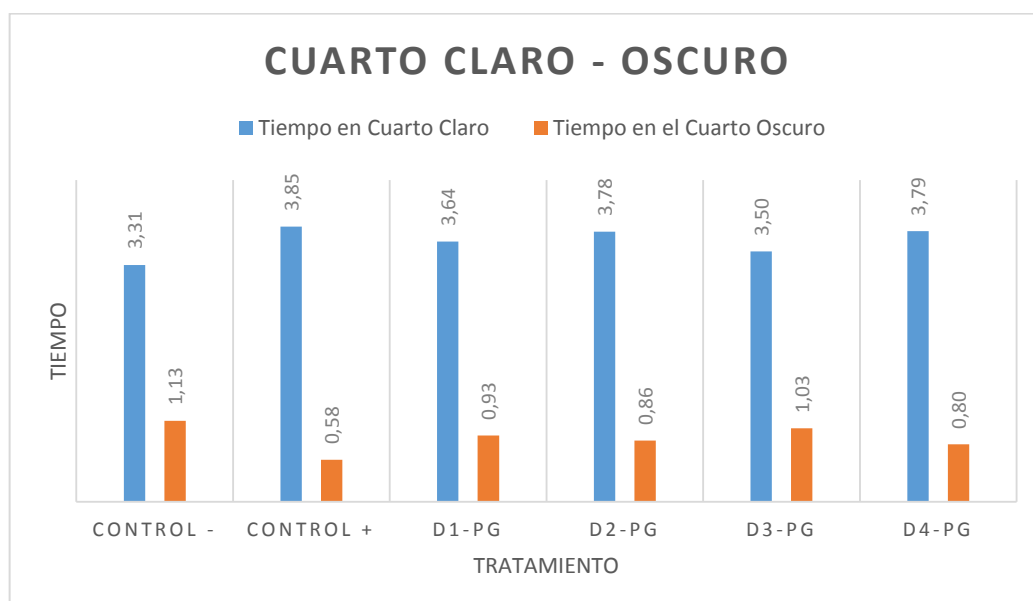
#### 3.6.1. Equipo electrónico de medición “Campo Claro-Oscuro”

##### 3.6.1.1 . Tiempo en el Cuarto Claro, Mitad y Cuarto Oscuro

**Tabla 6-3:** Resultados del tiempo en el cuarto claro y oscuro

Grupos	Tiempo en el Cuarto Claro	Tiempo en el Cuarto Oscuro
Control -	3,31	1,13
Control +	3,85	0,58
D1-PG	3,64	0,93
D2-PG	3,78	0,86
D3-PG	3,50	1,03
D4-PG	3,79	0,80

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020



**Gráfica 1-3** Tiempos de estancia en el Cuarto Claro y Oscuro en los diferentes tratamientos

**Realizado por:** Pachacama, Sebastián. 2020

En la tabla 6-3 y gráfica 1-3 se puede observar el tiempo promedio que el ratón permanece en el cuarto claro, en la gráfica se puede observar que existen dos tratamientos que se asemejan con el tiempo de permanencia del control positivo estos corresponden al tratamiento D2-PG con una dosis de 100 ppm y el valor fue de 3,78 minutos, de igual forma el tratamiento D4-PG con una dosis de 300 ppm y un tiempo de 3,79 minutos, el tiempo del control positivo fue de 3,85 minutos. Sin embargo, el tiempo en el cuarto oscuro el tratamiento D3-PG cuya dosis fue de 300 ppm se observa una diferencia más notoria respecto al control con 1,03 minutos.

**Tabla 7-3:** Test ANOVA para el Tiempo Cuarto Claro y Tiempo Cuarto Oscuro

ANOVA		Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
TIEMPO_CUARTO_CLARO	Inter-grupos	29,678	5	5,936	28,459	,000
	Intra-grupos	5,006	24	,209		
	Total	34,683	29			
TIEMPO_CUARTO_OSCURO	Inter-grupos	36,256	5	7,251	25,186	,000
	Intra-grupos	6,910	24	,288		
	Total	43,166	29			

**Realizado por:** Pachacama, Sebastián. 2020

Se puede visualizar en la Tabla 7-3 los datos del test de ANOVA del tiempo en el cuarto claro y en el cuarto oscuro, este test nos ayudó a rechazar la hipótesis nula que se planteó debido a que tiene un valor de significancia menor al 0.001 por lo tanto se procede a realizar el test de TUKEY el cual nos ayuda a determinar que pareja de medias son distintas.

**Tabla 8-3** Test TUKEY para el Tiempo Cuarto Claro y Tiempo Cuarto Oscuro

**TIEMPO\_CUARTO\_CLARO**  
HSD de Tukey<sup>a</sup>

tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Control -	5	1,1280		

<b>dosis2</b>	5		2,1100	
<b>dosis1</b>	5		2,4720	
<b>dosis3</b>	5			3,5000
<b>dosis4</b>	5			3,7840
<b>control</b>	5			3,8480
<b>Sig.</b>		1,000	,806	,830

### TIEMPO\_CUARTO\_OSCURO

HSD de Tukey<sup>a</sup>

tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
<b>control</b>	5	,5840	
<b>dosis4</b>	5	,8040	
<b>dosis2</b>	5	,8560	
<b>dosis3</b>	5	1,0240	
<b>dosis1</b>	5		2,9280
<b>Control -</b>	5		3,3140
<b>Sig.</b>		,784	,861

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

**Realizado por:** Pachacama, Sebastián. 2020

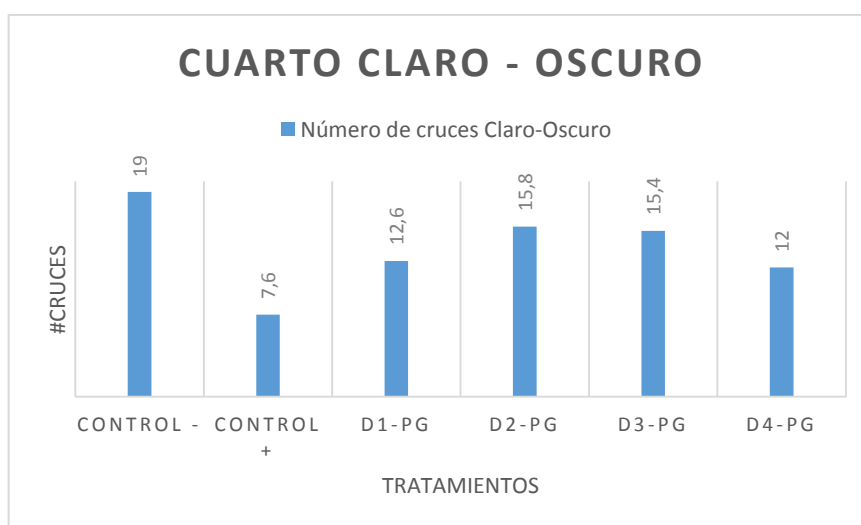
En la Tabla 8-3 se observa en el tiempo del cuarto claro la conformación de 3 subgrupos homogéneos: el primero con el control negativo, en el segundo la dosis 1 y dosis 2, y el último grupo formado por el control positivo, la dosis 3 y dosis 4; este último indica que los resultados entre ellos son estadísticamente similares, es decir, permanecieron más tiempo en el cuarto claro, lo que indica que el efecto de la Dosis 3 y 4 es parecido al efecto del medicamento. Mientras que, en el cuarto oscuro se visualiza la formación de dos subgrupos homogéneos, donde el control negativo junto con la dosis 1 permanece mayor tiempo en la zona oscura, en este caso este parámetro es indicativo del estrés que está experimentando el animal. Por lo que estadísticamente los efectos de las dosis 3, dosis 4 y control positivo presentan similar actividad ansiolítica según el tiempo de permanencia de los animales en la zona clara

### 3.6.1.2. Número de cruces Cuarto Claro-Oscuro, Distancia recorrida y Velocidad media

**Tabla 9-3** Resultados de número de cruces del cuarto claro-oscuro, distancia recorrida y velocidad media

Grupos	Número de cruces Claro-Oscuro	Distancia recorrida	Velocidad media
Control -	19	21,5	0,1
Control +	7,6	11,4	0,0
D1-PG	12,6	18,7	0,1
D2-PG	15,8	19,4	0,1
D3-PG	15,4	21,1	0,1
D4-PG	12	21,0	0,1

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

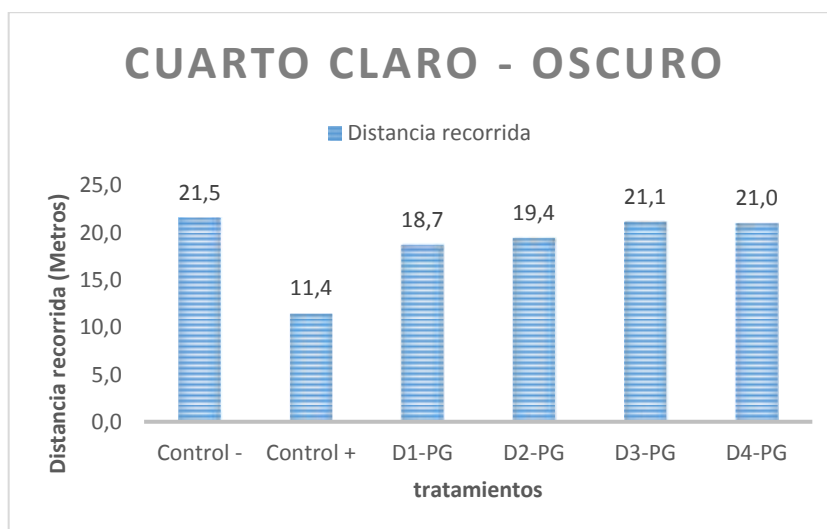


**Gráfica 2-3:** Número de cruces del Cuarto Claro y Oscuro en los diferentes tratamientos.

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

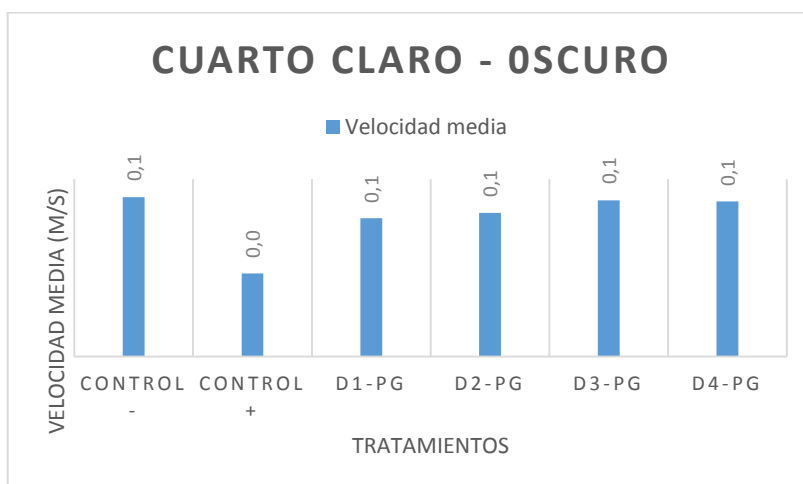
En la Tabla 9-3 y la gráfica 2-3 se puede observar el número de cruces que realizó el ratón en el equipo de cuarto claro y oscuro; el medicamento usado en el control positivo es Clonazepam, compuesto usado por sus importantes efectos ansiolíticos, sin embargo su principal problema es que inhibe la locomoción; el control negativo, al ser sometido a la administración de propilenglicol se pudo observar un mayor número de cruces a diferencia del control positivo, este parámetro ayuda a identificar si los tratamientos administrados ocasionan alguna alteración

en la locomoción del sujeto experimental, de ser así, sería un importante efecto adverso, por lo que las personas no podrían realizar actividades como caminar, manejar o manipular maquinaria pesada.



**Gráfica 3-3** Distancia Recorrida en los diferentes tratamientos

**Realizado por:** Pachacama, Sebastián. 2020



**Gráfica 4-3** Velocidad Media en los diferentes tratamientos.

**Realizado por:** Pachacama, Sebastián. 2020

En la tabla 9-3 y las gráficas 3-3 y 4-3; se observa la distancia recorrida y la velocidad media, estos parámetros junto con el número de cruces ayuda a identificar los efectos de los tratamientos sobre la locomoción. Por lo que se procedió al análisis estadístico para determinar si los resultados son o no estadísticamente diferentes

**Tabla 10-3** Test ANOVA para cruces en el cuarto claro-oscuro, distancia recorrida y velocidad media

**ANOVA**

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>NÚMERO_CRUCES</b>	Inter-grupos	383,467	5	76,693	6,858	,000
	Intra-grupos	268,400	24	11,183		
	Total	651,867	29			
<b>VELOCIDAD_MEDI A</b>	Inter-grupos	,005	5	,001	7,647	,000
	Intra-grupos	,003	24	,000		
	Total	,008	29			
<b>DISTANCIA_RECOR RIDA</b>	Inter-grupos	359,867	5	71,973	7,305	,000
	Intra-grupos	236,448	24	9,852		
	Total	596,315	29			

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

En la Tabla 10-3 se observa los resultados para el test de ANOVA de la distancia recorrida, velocidad media y el número de cruces que realizó el ratón en este equipo, como el valor de la significancia es menor a 0.001, prueba que las medias presentan diferencias; para saber cuáles medias son diferentes se procedió a realizar el test de TUKEY.

**Tabla 11-3** Test de TUKEY para cruces del cuarto claro-oscuro, distancia recorrida y velocidad media

**NÚMERO\_CRUCES**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
<b>Control +</b>	5	7,6000		
<b>dosis4</b>	5	12,0000	12,0000	
<b>dosis1</b>	5	12,6000	12,6000	12,6000
<b>dosis3</b>	5		15,4000	15,4000
<b>dosis2</b>	5		15,8000	15,8000
<b>Control -</b>	5			19,0000
<b>Sig.</b>		,209	,486	,058

**VELOCIDAD\_MEDIA**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Control +	5	,0360	,0620
dosis1	5		
dosis2	5		
dosis3	5		
dosis4	5		
Control -	5		
Sig.		1,000	,560

#### DISTANCIA\_RECORRIDA

HSD de Tukey<sup>a</sup>

tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Control +	5	11,4400	18,6800
dosis1	5		
dosis2	5		
dosis4	5		
dosis3	5		
Control -	5		
Sig.		1,000	,709

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

Como se visualiza en la Tabla 11-3, al hablar del número de cruces se observa la formación de 3 subgrupos homogéneos, considerando el valor de mayor significancia se observa que los tratamientos administrados en base a los extractos se agrupan entre ellos, lo que indica que sus medias en cuanto al número de cruces no es el mismo respecto al control positivo y control negativo. En cuanto a la velocidad media y a la distancia recorrida se puede observar la formación de dos subgrupos homogéneos, el primero conformado por el control positivo y el otro conformado por el control negativo y los diferentes tratamientos, indicando que la locomoción no se ve afectada. Debido a que el resultado de la velocidad media y distancia recorrida del control positivo es significativamente menor, respecto a los demás. Por lo que se puede concluir que los tratamientos según este equipo podrían presentar actividad ansiolítica sin inhibir los procesos motores de los pacientes.



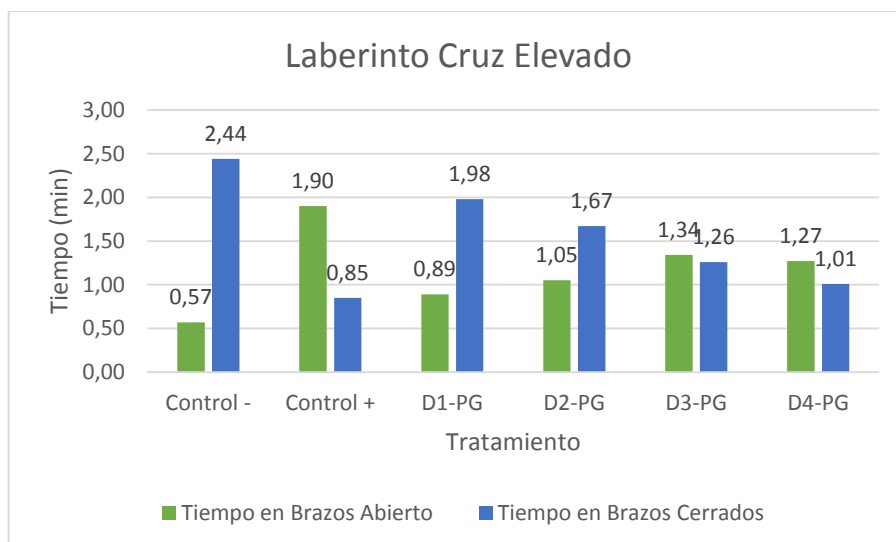
### 3.6.2. Equipo electrónico de medición “Laberinto en elevado en cruz”

#### 3.6.2.1. Tiempo en brazos abiertos y cerrados

**Tabla 12-3** Resultados del tiempo en Brazos Abiertos y Brazos Cerrados

Grupos	Tiempo en Brazos Abierto	Tiempo en Brazos Cerrados
Control -	0,57	2,44
Control +	1,90	0,85
D1-PG	0,89	1,98
D2-PG	1,05	1,67
D3-PG	1,34	1,26
D4-PG	1,27	1,01

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020



**Gráfica 5-3** Tiempo en brazos abierto y brazos cerrados en los diferentes tratamientos.

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

En la tabla 12-3 y gráfico 5-3 se detalla el promedio del tiempo que el ratón pasó en los brazos abiertos. Como se observa el control positivo permaneció aproximadamente 1,90 minutos en los brazos abiertos, al igual que las dosis D3-PG y D4-PG, mientras que el blanco, D1-PG y D2PG permanecieron mayor tiempo en los brazos cerrados. Para determinar si sus resultados son estadísticamente semejantes se realizó el test de Anova

**Tabla 13-3** Test ANOVA para el Tiempo en brazos abiertos y brazos cerrados

**ANOVA**

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>TIEMPO_BRAZOS_ABIERTOS</b>	Inter-grupos	43857,049	5	8771,410	7,169	,000
	Intra-grupos	29364,871	24	1223,536		
	Total	73221,920	29			
<b>TIEMPO_BRAZOS_CERRADOS</b>	Inter-grupos	41630,915	5	8326,183	13,178	,000
	Intra-grupos	15163,602	24	631,817		
	Total	56794,517	29			

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

Se realizó el test de Anova para el parámetro del tiempo en los brazos abiertos y cerrado como se observa en la tabla 13-3, se obtuvo un valor de significancia menor a 0,001 indicando que existen medias diferentes; por lo que se procede a realizar el test de TUKEY, para identificar los tratamientos diferentes

**Tabla 14-3** Test TUKEY para el Tiempo en brazos abiertos y brazos cerrados

**TIEMPO\_BRAZOS\_ABIERTOS**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Control - dosis1	5	33,9000	
dosis2	5	73,1880	73,1880
Control + dosis4	5		103,1840
dosis3	5		128,1280
	5		138,0980
	5		138,3020
<b>Sig.</b>		,499	,069

**TIEMPO\_BRAZOS\_CERRADOS**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
dosis4	5	46,3620		
Control + dosis3	5	51,1940		
	5	51,6060		

<b>dosis2</b>	5	93,9540	93,9540	
<b>dosis1</b>	5		112,5360	112,5360
<b>Control -</b>	5			146,2200
<b>Sig.</b>		,062	,847	,311

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

**Realizado por:** Pachacama, Sebastián. 2020

Como se observa en la Tabla 14-3, para el tiempo de permanencia en los brazos abiertos hay la formación de dos subgrupos homogéneos, siendo el grupo conformado por la dosis 1 y el control negativo el que presenta mayor valor de significancia, indicando que sus medias son significativamente semejantes, es decir, que la dosis uno con el control negativo permanecen el menor tiempo posible en lugares abiertos indicando que el sujeto de experimentación está estresado; con respecto al tiempo en los brazos cerrados se forman 3 subgrupos, el de mayor significancia se encuentra formado por la dosis 1 y dosis 2, en este caso se puede observar que permanecen más tiempo en los brazos cerrados con medias parecidas tanto la dosis 1 y 2, como el valor del control – y dosis 1, indicando que los sujetos de experimentación con estos tratamientos permanecen mayor tiempo en ambientes oscuros y que se conserva el nivel de estrés inicial.

Los resultados obtenidos en el equipo de laberinto en cruz elevado pueden verse influenciados por la estructura física, debido a que, con el uso, la plataforma se ha ido debilitando y presenta zonas con menor estabilidad; por lo que posiblemente el animal al intentar desplazarse por los brazos abiertos no se siente confiado y seguro por lo que se mantiene en movimiento en zonas físicamente más resistentes.

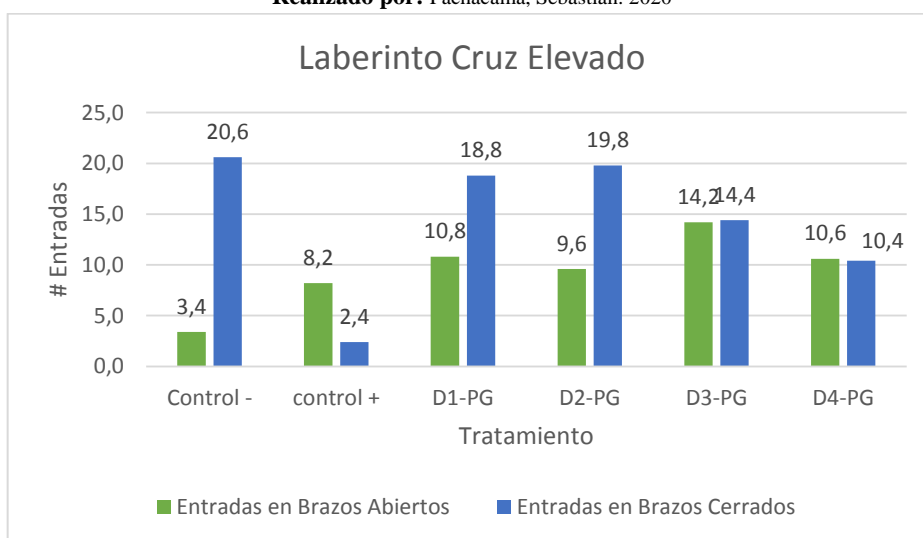
### 3.6.2.2. Entradas en brazos abiertos y cerrados

**Tabla 15-3** Resultados del número de Entradas a Brazos Abiertos y Brazos Cerrados

<b>Grupos</b>	<b>Entradas en Brazos Abiertos</b>	<b>Entradas en Brazos Cerrados</b>
<b>Control -</b>	3,4	20,6
<b>Control +</b>	8,2	2,4
<b>D1-PG</b>	10,8	18,8
<b>D2-PG</b>	9,6	19,8
<b>D3-PG</b>	14,2	14,4

<b>D4-PG</b>	10,6	10,4
--------------	------	------

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020



**Gráfica 6-3** Entradas en brazos abiertos y brazos cerrados de los modelos animales

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

El indicador del número de entradas a los brazos abiertos puede observar en la tabla 15-3 y la gráfica 6-3; el control positivo presenta un mayor número de entradas a los brazos abiertos al igual que la dosis D4-PG. Por lo contrario, el blanco, D1-PG y D2-PG, tienen mayor número de entradas a los brazos cerrados.

**Tabla 16-3** Test ANOVA del número de Entradas a Brazos Abiertos y Brazos Cerrados

**ANOVA**

		Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>ENTRADA_BRAZOS_ABIERTOS</b>	Inter-grupos	652,567	5	130,513	9,423	,000
	Intra-grupos	332,400	24	13,850		
	Total	984,967	29			
<b>ENTRADA_BRAZOS_CERRADOS</b>	Inter-grupos	1467,067	5	293,413	15,593	,000
	Intra-grupos	451,600	24	18,817		
	Total	1918,667	29			

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

Los resultados del análisis estadístico en el test ANOVA del número de entradas a los brazos abiertos y cerrados se observa en la tabla 16-3, se obtuvo un valor de significancia menor a 0,001; indicando que hay diferencias entre las medias del número de entradas, por lo que se procede a realizar el test de TUKEY, para identificar cuáles son los tratamientos diferentes.

**Tabla 17-3** Test TUKEY del número de Entradas a Brazos Abiertos y Brazos Cerrados.

**ENTRADA\_BRAZOS\_ABIERTOS**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Control -	5	6,4000		
dosis2	5	9,6000	9,6000	
dosis1	5	10,8000	10,8000	
dosis4	5		14,6000	14,6000
dosis3	5		16,2000	16,2000
Control +	5			20,6000
<b>Sig.</b>		,444	,091	,149

**ENTRADA\_BRAZOS\_CERRADOS**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Control +	5	2,4000	
dosis3	5	6,2000	
dosis4	5	8,2000	
dosis2	5		17,8000
dosis1	5		18,8000
Control -	5		20,6000
<b>Sig.</b>		,314	,906

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

**Realizado por:** Pachacama, Sebastián. 2020

Como se puede observar en la tabla 17-3, en el número de entradas a los brazos abiertos se forman dos subgrupos presentando el valor de mayor significancia el grupo formado por el control negativo y la dosis 1 y 2, indicando que los animales de experimentación a los cuales se administró estos tres tratamientos presentaron un número menor de entradas a espacios abiertos y se mostraron menos exploradores y relajados; de igual forma en el número de entradas a los brazos cerrados se forman dos subgrupos, presentando un valor de mayor significancia nuevamente el grupo formado por el control negativo y la dosis 1 y 2, en este caso, los sujetos de experimentación buscaron un mayor número de veces permanecer en sitios seguros y menos

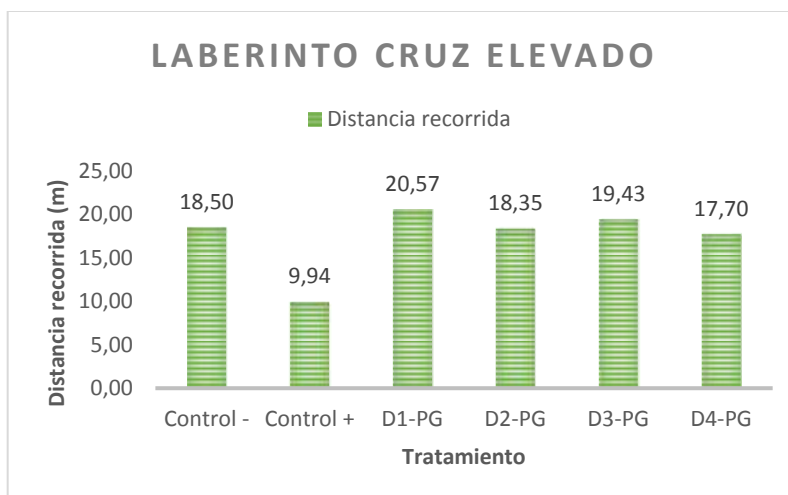
estresantes para ellos. En este caso, se concluye que las dosis 1, dosis 2 y control negativo no evidencian efectos ansiolíticos.

### 3.6.2.3 Distancia recorrida y velocidad media

**Tabla 18-3** Resultados de la distancia Recorrida y Velocidad media

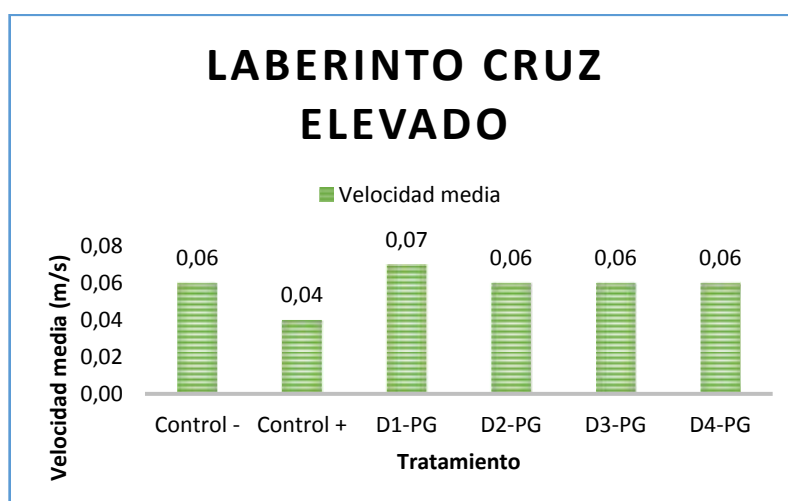
Grupos	Distancia recorrida	Velocidad media
Control -	18,50	0,06
Control +	9,94	0,04
D1-PG	20,57	0,07
D2-PG	18,35	0,06
D3-PG	19,43	0,06
D4-PG	17,70	0,06

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020



**Gráfica 7-3:** Distancia recorrida en los diferentes tratamientos

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020



**Gráfica 8-3:** Velocidad media en los diferentes tratamientos

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

Como observa en la tabla 18-3 y las gráficas 7-3 y 8-3; respecto a la distancia recorrida y la velocidad media se podría decir que las dosis D1-PG, D2-PG, D3-PG y D4-PG no afectan a la locomoción, para comprobarlo se aplicó el test de Anova y el Tukey.

**Tabla 19-3** Test ANOVA de Distancia recorrida y Velocidad media

**ANOVA**

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>VELOCIDAD_MEDIA</b>	Inter-grupos	,006	5	,001	6,117	,001
	Intra-grupos	,005	24	,000		
	Total	,010	29			
<b>DISTANCIA_RECORRIDA</b>	Inter-grupos	478,483	5	95,697	9,342	,000
	Intra-grupos	245,848	24	10,244		
	Total	724,331	29			

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

En la Tabla 19-3 se observa el test de ANOVA de los datos de distancia recorrida, velocidad media que realizó el ratón en este equipo, como el valor de significancia es menor a 0.001 indica que hay medias con diferencias, por lo que se procede a realizar el test de TUKEY.

**Tabla 20-3** Test TUKEY para Distancia recorrida y Velocidad media

**VELOCIDAD\_MEDIA**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2

<b>Control + dosis4</b>	5	,0280	
<b>dosis3</b>	5		,0580
<b>Control - dosis2</b>	5		,0640
<b>dosis1</b>	5		,0640
<b>Sig.</b>		1,000	,737

**distancia\_recorrida**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
<b>Control + dosis4</b>	5	9,3360		
<b>dosis3</b>	5		15,7020	
<b>dosis2</b>	5		17,4300	17,4300
<b>Control - dosis1</b>	5		18,3540	18,3540
<b>Sig.</b>		1,000	,736	,153

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

Como se visualiza en la Tabla 20-3, sobre los parámetros de distancia recorrida y velocidad media en ambos se forman dos subgrupos siendo el conformado únicamente por el control positivo el que presenta mayor significancia, lo que indica que el grupo de ratones a los cuales se administró el medicamento presenta significativamente menor distancia recorrida y menor velocidad media, lo que corrobora el efecto adverso característico de este medicamento.

### 3.6.3. Equipo electrónico de medición “Campo Abierto”

#### 3.6.3.1. Tiempo en el Centro, Interior, Laterales y Esquinas

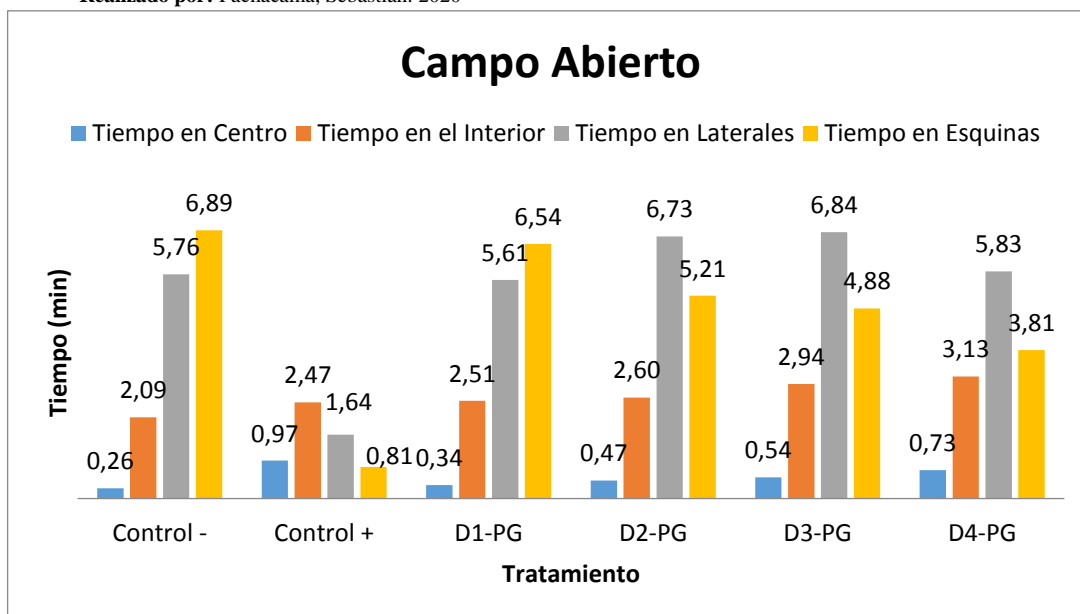
**Tabla 21-3** Resultados del tiempo en el centro, interior, esquinas y laterales

Grupos	Tiempo en Centro	Tiempo en el Interior	Tiempo en Laterales	Tiempo en Esquinas
<b>Control -</b>	0,26	2,09	5,76	6,89
<b>Control +</b>	0,97	2,47	1,64	0,81
<b>D1-PG</b>	0,34	2,51	5,61	6,54
<b>D2-PG</b>	0,47	2,60	6,73	5,21



<b>D3-PG</b>	0,54	2,94	6,84	4,88
<b>D4-PG</b>	0,73	3,13	5,83	3,81

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020



**Gráfica 9-3** Tiempos de estancia en el centro, interior, laterales y esquina de los diferentes tratamientos.

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

En la tabla 21-3 y en la gráfica 9-3 que corresponde a los tiempos de estancia del ratón en el equipo Campo Abierto, se puede decir que el control negativo junto con los tratamientos D1-PG y D2-PG (25-100 ppm) al parecer permanecen mayor tiempo en las esquinas y laterales siendo un indicativo de que los bio modelos presentan comportamientos de ansiedad. Mientras que, al observar los valores del control positivo y los tratamientos D3-PG y D4-PG (200 y 300 ppm) permanecen mayor tiempo en el centro y en el interior del equipo lo que indica la capacidad exploratoria del animal y un estado de ánimo relajado. Por lo que se procede con el análisis estadístico.

**Tabla 22-3** Test ANOVA para el tiempo en el centro, interior, esquinas y laterales

**ANOVA**

		Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>TIEMPO_ CENTRO</b>	Inter-grupos	5,972	5	1,194	19,567	,000
	Intra-grupos	1,465	24	,061		
	Total	7,437	29			
<b>TIEMPO_ INTERIOR</b>	Inter-grupos	11,013	5	2,203	6,016	,001
	Intra-grupos	8,787	24	,366		
	Total	19,800	29			

<b>TIEMPO_</b> <b>LATERALES</b>	Inter-grupos	23,080	5	4,616	5,908	,001
	Intra-grupos	18,750	24	,781		
	Total	41,830	29			
<b>TIEMPO_</b> <b>ESQUINA</b>	Inter-grupos	38,774	5	7,755	6,301	,001
	Intra-grupos	29,537	24	1,231		
	Total	68,311	29			

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

En la Tabla 22-3 se observa los datos obtenidos en el test de ANOVA, para el tiempo en el centro, tiempo en el interior, tiempo en los laterales y el tiempo en las esquinas, presentando un valor de significancia igual o menor a 0,001 lo que permite aceptar la hipótesis alternativa la cual menciona que existen al menos un par de medias diferencias, por lo que se procede a realizar el test de TUKEY, para identificar cuáles son diferentes.

**Tabla 23-3** Test TUKEY para el tiempo en el centro, interior, esquinas y laterales

<b>TIEMPO_CENTRO</b>			
HSD de Tukey <sup>a</sup>			
tratamient os	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Control -	5	,2660	
dosis1	5	,5420	
dosis2	5	,6260	
dosis4	5		1,2300
dosis3	5		1,3420
Control +	5		1,4340
Sig.		,231	,779
<b>TIEMPO_INTERIOR</b>			
HSD de Tukey <sup>a</sup>			
tratamient os	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Control -	5	1,6860	
dosis1	5	2,5080	2,5080
dosis2	5	2,5960	2,5960
dosis4	5	2,7320	2,7320
dosis3	5		3,1420
Control +	5		3,6660
Sig.		,105	,058
<b>TIEMPO_LATERALES</b>			

HSD de Tukey <sup>a</sup>			
tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
dosis3	5	4,8380	
Control +	5	4,9980	
dosis4	5	5,0280	
dosis1	5	5,6120	
dosis2	5	6,1260	6,1260
Control -	5		7,3580
Sig.		,231	,272

TIEMPO_ESQUINA				
HSD de Tukey <sup>a</sup>				
tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
dosis3	5	4,4800		
Control +	5	4,9000	4,9000	
dosis4	5	5,2140	5,2140	5,2140
Control -	5		6,8920	6,8920
dosis2	5		7,0120	7,0120
dosis1	5			7,3420
Sig.		,897	,060	,057

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

Como se observa en la tabla 23-3, el test de Tukey señala los grupos con medias semejantes: para el primer parámetro sobre el tiempo en el centro, los animales que permanecen más tiempo en esta zona es un indicativo de que están relajados, incluso con ánimo explorador, ya que permanecen expuestos y con una gran cantidad de luz, en este caso se presentan dos subgrupos, siendo el de mayor significancia el conformado por el control positivo y el tratamiento de dosis 3 y dosis 4. En el tiempo de permanencia en el interior se forman nuevamente dos subgrupos, en este caso, sin embargo, el grupo con mayor significancia está formado por el control negativo, dosis 1, dosis 2 y dosis 4 indicando que sus medias son significativamente parecidas y que en este espacio permanecen un tiempo similar. El tiempo en los laterales indica que el sujeto de experimentación se encuentra estresado, pero exploratorio, en este caso presentaron un valor estadísticamente similar el control negativo y la dosis 2.

Un mayor tiempo de permanencia en esquinas indica que el sujeto se encuentra bastante estresado y que busca un refugio seguro, para este parámetro se formaron 3 subgrupos, presentando una mayor significancia el conformado por la dosis 3 y 4 y el control positivo, indicando que el tiempo promedio que ellos pasan en estos sitios es significativamente menor que los demás tratamientos.

Por lo tanto, se puede decir que, según los parámetros analizados en este equipo, el extracto de las hojas de *P. guajava*, tienen actividad ansiolítica en las dosis 3 y 4 afectando de manera poco significativa la locomoción

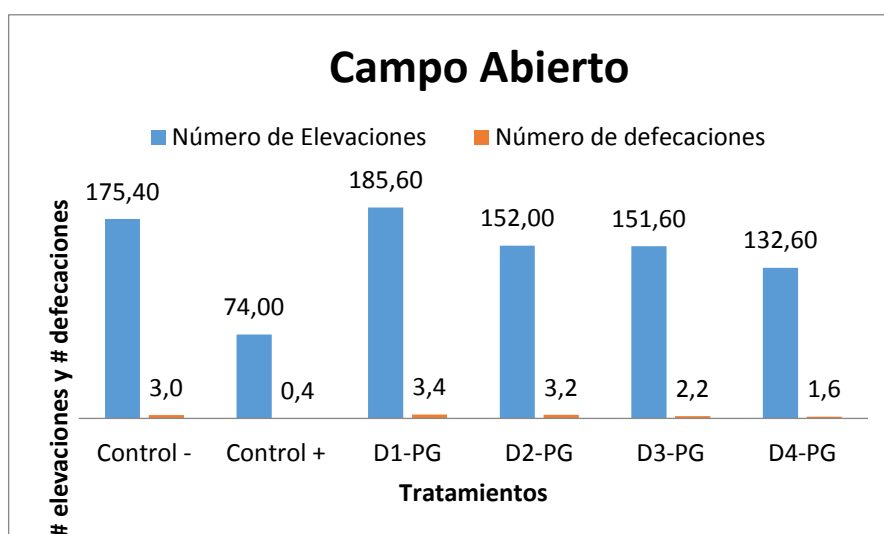
Al realizar una comparación de los resultados obtenidos en este mismo equipo con otros extractos investigados como: *Lavandula officinalis*, *Hypericum laricifolium* y *Melissa Officinalis*, se observa que a las especies vegetales anteriormente mencionadas presentan efecto ansiolítico a concentraciones de 100 y 200 ppm mostrando efectos similares *Psidium guajava*. No se puede realizar una comparación con el extracto de *Peperomia peltigera*, debido que la concentración utilizada fue pequeña (25 ppm).

### 3.6.3.2. Número de defecaciones y elevaciones

**Tabla 24-3:** Resultados del Número de Elevaciones y Defecaciones

<b>Grupos</b>	<b>Número de Elevaciones</b>	<b>Número de defecaciones</b>
<b>Control -</b>	175,40	3,0
<b>Control +</b>	74,00	0,4
<b>D1-PG</b>	185,60	3,4
<b>D2-PG</b>	152,00	3,2
<b>D3-PG</b>	151,60	2,2
<b>D4-PG</b>	132,60	1,6

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020



**Gráfica 10-3** Número de elevaciones y defecaciones en los diferentes tratamientos

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

El equipo campo abierto presenta un mayor número de parámetros que ayudan a determinar el nivel de ansiedad o el efecto que presentan los tratamientos administrados al ratón, como se puede observar en la Tabla 24-3 y en la gráfica 10-3 se visualiza el número de defecaciones y las elevaciones que realiza el ratón en el equipo, partiendo del concepto que un mayor número de defecaciones se relaciona a un nivel mayor de estrés, mientras que las elevaciones indican locomoción y en bajo porcentaje exploración del animal.

**Tabla 25-3** Test ANOVA para el Número de Elevaciones y Defecaciones

**ANOVA**

		Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>ELEVACIONES</b>	Inter-grupos	47644,667	5	9528,933	17,738	,000
	Intra-grupos	12892,800	24	537,200		
	Total	60537,467	29			
<b>DEFECACIONES</b>	Inter-grupos	29,067	5	5,813	8,507	,000
	Intra-grupos	16,400	24	,683		
	Total	45,467	29			

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

Los resultados del número de elevaciones y defecaciones se analizaron mediante el test de ANOVA como se observa en la Tabla 25-3, se obtuvo una significancia menor a 0,00, que

indica que existe medias diferentes, por lo que se procede a realizar el test de TUKEY para determinar cuáles son distintas.

**Tabla 26-3** Test TUKEY para el Número de Elevaciones y Defecaciones

**ELEVACIONES**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

tratamiento s	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Control +	5	74,0000		
dosis4	5		131,6000	
dosis2	5		132,0000	
dosis1	5		136,6000	
Control -	5		175,4000	175,4000
dosis3	5			201,6000
<b>Sig.</b>		1,000	,062	,492

**DEFECACIONES**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

tratamiento s	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Control +	5	,2000		
dosis4	5	1,0000	1,0000	
dosis3	5		2,0000	2,0000
dosis2	5		2,2000	2,2000
dosis1	5			2,8000
Control -	5			3,0000
<b>Sig.</b>		,649	,235	,419

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,000.

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

Como se observa en la tabla 26-3, se forman dos subgrupos para ambos parámetros, en el caso del número de elevaciones presenta un mayor valor de significancia el grupo formado por el control positivo, como se había mencionado el resultado obtenido indica que hay un menor número de elevaciones relacionado en este caso con los efectos del clonazepam sobre la locomoción.

Mientras que, en el parámetro de defecaciones, hay un número significativamente menor en el subgrupo de los tratamientos conformados por el control positivo y la dosis 4. El número de elevaciones y el número de defecaciones indican que los extractos usados no afectan la

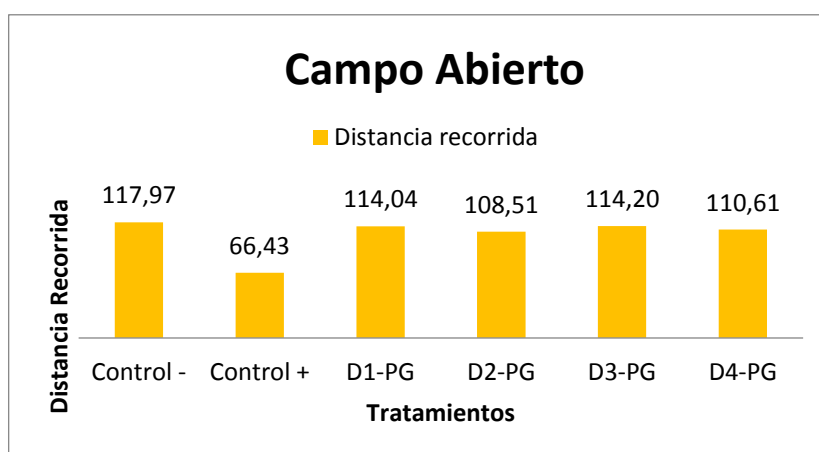
locomoción y que el extracto 4 disminuye la ansiedad al disminuir el número de defecaciones al igual que el control positivo.

### 3.6.3.3. *Distancia recorrida y Velocidad media*

**Tabla 27-3** Resultados de la Distancia Recorrida y Velocidad media

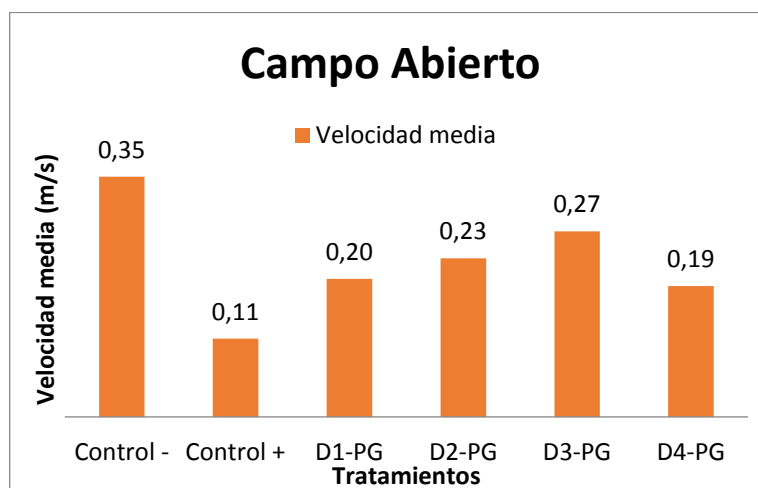
Grupos	Distancia recorrida	Velocidad media
Control -	117,97	0,35
Control +	66,43	0,11
D1-PG	114,04	0,20
D2-PG	108,51	0,23
D3-PG	114,20	0,27
D4-PG	110,61	0,19

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020



**Gráfica 11-3:** Distancia Recorrida en los diferentes tratamientos

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020



**Gráfica 12-3** Velocidad media en los diferentes tratamientos

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

Como se puede observar en la tabla 27-3 y las gráficas 11-3 y 12-3; al parecer la distancia recorrida y la velocidad media de los extractos en sus diferentes dosis D1-PG, D2-PG, D3-PG no afectan la locomoción, mientras que el control positivo presenta menor movilidad y desplazamiento.

**Tabla 28-3** Test ANOVA para Distancia Recorrida y Velocidad media

**ANOVA**

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>VELOCIDAD_MEDIA</b>	Inter-grupos	,041	5	,008	10,707	,000
	Intra-grupos	,018	24	,001		
	Total	,059	29			
<b>DISTANCIA_RECORRIDA</b>	Inter-grupos	20184,191	5	4036,838	6,903	,000
	Intra-grupos	14034,163	24	584,757		
	Total	34218,354	29			

Realizado por: Pachacama, Sebastián. 2020

El test de ANOVA para los resultados de la distancia recorrida, velocidad media se detalla en la Tabla 28-3, se observa que el valor de la significancia es menor a 0.001 indicando que existen por lo menos un par de medias diferentes, por lo que se procede a realizar el test de TUKEY

**Tabla 29-3** Test TUKEY para Distancia Recorrida y Velocidad media

**VELOCIDAD\_MEDIA**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Control +	5	,0320	
dosis2	5		,1100
dosis1	5		,1240
dosis4	5		,1240
dosis3	5		,1260
Control -	5		,1480
Sig.		1,000	,285

**DISTANCIA\_RECORRIDA**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2



Control +	5	44,4280	
dosis2	5	88,5120	88,5120
dosis4	5		110,6060
dosis1	5		114,0380
dosis3	5		114,2000
control -	5		117,9700
Sig.		,078	,411

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestra de la media armónica = 5,000.

**Realizado por:** Pachacama, Sebastián. 2020

Como se detalla en la Tabla 29-3, la velocidad media y la distancia recorrida indican la locomoción del sujeto de experimentación. En el caso de la velocidad media se observa la formación de dos subgrupos presentado que el control positivo presenta una velocidad media significativamente menor, respecto a los demás grupos. De igual forma se observa que el control positivo y el extracto 2, presentan una menor distancia recorrida. En conclusión, se puede observar que los extractos en su dosis 1, dosis 3 y dosis 4 no afectan la locomoción del biomodelo.

#### **3.6.4. Discusión general de los resultados**

Al realizar los ensayos sobre el control de calidad de la droga cruda se pudo concluir que cumplieron con todos los parámetros establecidos en la USP35, indicando que su empleo en las diferentes pruebas es seguro.

Mediante el tamizaje fitoquímico se identificó metabolitos secundarios de gran importancia, como fenoles totales, alcaloides, flavonoides, azúcares y lactonas. Los cuales presentan diversas actividades biológicas como antisépticas, antioxidantes y sedantes.

Con respecto a los ensayos organolépticos se puede decir que presentan características propias del extracto, y el solvente empleado.

Para la actividad ansiolítica se empleó modelos no condicionados con 3 equipos experimentales (cuarto claro-oscuro, laberinto en cruz elevado y campo abierto), los mismos que ayudaron a establecer que la especie vegetal presenta efecto ansiolítico a concentraciones de 100 ppm, 200 ppm y 300 ppm. Sobre la locomoción ningún extracto inhibe significativamente el desplazamiento y agilidad del sujeto de experimentación.

En el equipo cuarto claro-oscuro, el ensayo se realizó por 5 minutos, las dosis que presentaron actividad ansiolítica fueron las de 100 ppm y 300 ppm, esto al presentar valores estadísticamente similares con el control positivo; respecto a la velocidad media, distancia recorrida y el número de cruces se puede decir que ningún extracto *P. guajava* afectó la locomoción del ratón.

En cuanto al Laberinto en cruz elevada, estadísticamente hablando las dosis que presentaron efecto ansiolítico fueron los extractos de 200 ppm y 300 ppm basándose en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos. Por otra parte, las dosis mencionadas no afectaron el número de entradas a los brazos abiertos y cerrados, velocidad media y a la distancia recorrida indicando que ejercen poca o nula acción sobre la locomoción del ratón.

En cuanto a los resultados del equipo Campo abierto, al tener más parámetros que los demás equipos este ayuda a determinar de forma completa el efecto ansiolítico y el efecto locomotor; el extracto a dosis de 200 ppm y 300 ppm permite que el ratón permanezca mayor tiempo en el centro y en el interior del equipo, indicando que los extractos presentan actividad ansiolítica al presentar valores estadísticamente similares con el control positivo. Con respecto a la velocidad media, distancia recorrida y elevaciones, la especie vegetal no afecta su locomoción; las dosis de 200 ppm y 300 ppm tienden a disminuir sus efectos cerca de terminar el tiempo de los ensayos.

Los metabolitos secundarios como los terpenos, flavonoides, alcaloides y esteroides, comparten mecanismos de acción que incluyen la activación de la enzima crítica para la síntesis de catecolaminas o la inhibición de sus enzimas limitantes, MAO-A y MAO-B, y transportadores, estimulando así la monoamina de almacenamiento vesicular y la liberación de neurotransmisores hacia la hendidura sináptica. Por último, pueden prevenir la producción de ROS e inhibir la síntesis de NO y, posteriormente, interactuar con los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, GABA<sub>A</sub> y los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta$  que contribuyen a estimular la PKA (proteína quinasa A). Una consecuencia es que CREB aumenta los niveles de factor neurotrófico derivado del cerebro, que favorecen la aparición de contactos dendríticos que mejoran la neurotransmisión cerebral y modulan las emociones (García-Ríos, 2020).

## CONCLUSIONES

Previo a la comprobación de la actividad ansiolítica de la especie vegetal se realizaron las pruebas de control de calidad de la droga cruda y del extracto hidroalcohólico de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*) cumpliendo todos los parámetros establecidos en la USP 35, haciéndola segura para las pruebas posteriores.

Se identificaron cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en las hojas de guayaba (*Psidium guajava*) como: alcaloides, azúcares, compuestos fenólicos, lactonas, quinonas y flavonoides. Posiblemente los compuestos fenólicos y alcaloides contribuyen a la actividad biológica de la planta.

Se determinó la cantidad de flavonoides y fenoles totales presentes en el extracto de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*), obteniendo 86,32 mg Equivalentes de Quercetina/g de extracto seco para flavonoides totales y 304,67 mg Equivalentes de ácido Gálico/g de extracto seco para fenoles totales. Comparando los resultados que se obtuvieron en otras plantas previamente

estudiadas como *Lavandula officinalis*, *Melissa officinalis*, *Hypericum laricifolium* y *Peperomia peltigera*, es un valor alto de flavonoides y fenoles totales, pero un valor bajo a comparación de *Passiflora manicata* y *Passiflora tripartita* que contienen 661,68 mg Equivalentes de Quercetina/g y 157,53 mg Equivalentes de Quercetina/g, respectivamente.

Se determinó que las dosis con mayor efectividad fueron las de 200 mg/kg y 300 mg/kg, lo cual se comprobó estadísticamente debido a que presentaban valores similares a los obtenidos con el control positivo en parámetros que señalan menor nivel de estrés y mayor actitud exploratoria. Además, se observó que la locomoción del roedor no fue afectada debido a que no formó ningún grupo con el control positivo en parámetros como distancia recorrida, velocidad media y elevaciones considerándose una gran ventaja frente a los fármacos tradicionales usados para la ansiedad.

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda realizar el tamizaje fitoquímico de las diferentes partes de la planta de *Psidium guajava* para determinar sus compuestos secundarios, y se sugiere analizar el efecto ansiolítico de estas partes debido a que existen muy pocos estudios.

Se recomienda realizar una evaluación de toxicidad de las hojas de *Psidium guajava*, para analizar los posibles peligros que se puede dar por la constante administración de esta planta a dosis de 200 y 300 ppm.

Se recomienda realizar los diferentes ensayos de ansiedad en completo silencio y sin filtración de luz hacia los equipos.

Se recomienda calcular el umbral exacto de cada equipo para no tener datos erróneos al momento de procesar los videos.

Se recomienda usar una computadora con procesador avanzado como la CORE i7, para no tener problemas a la hora de instalar los distintos programas que se van a utilizar en el procesamiento de los videos.

## **GLOSARIO**

**ITOP:** software utilizado para verificar los movimientos realizados por el ratón en el equipo cuarto claro-oscuro y en el equipo de laberinto de cruz elevado, con los parámetros para determinar la actividad ansiolítico en los tiempos determinados

**EMIS:** software utilizado para verificar los movimientos realizados por el ratón en el equipo de campo abierto, nos nos permite evaluar la actividad ansiosa por medio de diferentes parámetros a evaluar en un tiempo determinado.

**CeAM:** central de la amígdala

**TOC:** trastorno obsesivo compulsivo

**TEPR:** Trastorno de estrés postraumático

**GABA:** neurotransmisor: (ácido gama amino butírica)

## BIBLIOGRAFÍA

- Akila, R, V., & R, H. G. (2018). Development and evaluation of functional property of guava leaf based herbal tea. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3036-3039.
- Akinjogunla, Etok, & Oshoma. (2011). Preliminary phytochemistry and in-vitroantibacterial efficacy of Hydro-Ethanollic leaf extracts of Psidium guajava on common urinary tract Bacterial Pathogen. *Bioresearch Bulletin*, 5, 329 - 336.
- Alcivar, L., Muñoz, F., & Cadena, E. (2011). *Produccion-y-comercializacion-de-guayaba-mermelada*. Recuperado el 01 de Noviembre de 2019, de <https://www.slideshare.net/xavierbasurto/produccion-y-comercializacion-de-guayaba-mermelada>
- Antonacci, M. (s.f.). *Cuatro razones para usar plantas medicinales*. Recuperado el 24 de Julio de 2018, de <https://www.vix.com/es/imj/salud/152519/4-razones-para-usar-plantas-medicinales>
- BALAM. (s.f). La medicina Maya actual Merida - Yucatan. *Centro de Investigacion y estudios avanzados*.
- Botanical.online*. (s.f.). Recuperado el 24 de Julio de 2018, de Importancia de las plantas: <https://www.botanical-online.com/plantasmedicinalesimportancia.htm>
- Botto, A., Acuña, J., & Jiménez, J. P. (2014). La depresión como un diagnóstico complejo. Implicancias para el desarrollo de recomendaciones clínicas. *Revista médica de Chile*, 142(10), 1297-1305.
- BUSTOS, G. (2013). *DISEÑO EN ALIMENTOS DERIVADOS DE LA GUAYABA, EMPLEANDO PROCESOS SIMPLES DE CONSERVACIÓN*". Recuperado el 01 de Noviembre de 2019, de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/5738/T-PUCE-5893.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Corbin, J. A. (s.f.). *Psicología y Mente*. Recuperado el 24 de Julio de 2018, de Los 7 tipos de ansiedad (causas y síntomas): <https://psicologiymente.com/clinica/tipos-de-ansiedad>
- David Moreno, J. J. (Mayo de 2018). Implementación de sistemas evaluadores de conducta ansiolítica en ratones de laboratorio utilizando procesamiento digital de imágenes. *MASKAY*, 8(1), 27-34.
- DspaceESPOCH. (2019). *Tesis Bioquímica y Farmacia*. Recuperado el 02 de noviembre de 2019, de <http://dspace.epoch.edu.ec/handle/123456789/84?offset=20>
- EMOL. (23 de Febrero de 2017). Recuperado el 24 de Julio de 2018, de OMS: Un 4,4% de la población mundial sufre de depresión y casos aumentan un 18% en 10 años:

<http://www.emol.com/noticias/Tendencias/2017/02/23/846361/OMS-Un-44-de-la-poblacion-mundial-sufre-de-depresion-y-casos-aumentan-un-18-en-10-anos.html>

- Eyong, K. O., Victor, E., & Thomas, K. &. (2013). Quinones and Benzophenones from the Medicinal Plants of Africa. *Pharmacology and Chemistry*, 351 - 391.
- GODOY, M. (2018). "DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DE *Hypericum laricifolium* (ROMERILLO) EN RATONES (*Mus musculus*).". 129. Riobamba, Ecuador.
- Goldberg, J. (11 de Mayo de 2018). *Medical Reference* . Recuperado el 08 de noviembre de 2019, de <https://www.webmd.com/depression/how-depression-affects-your-body#2>
- Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009). The Open Field Test. *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice*, 42, 1 - 20.
- Grover IS, B. S. (s.f.). Study on Antimutagenic effects of guava in *S. typhimurium*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 1-3.
- Gutiérrez, L. G., Chilpa, R. R., & Jaime, H. B. (2014). Medicinal plants for the treatment of "nervios", anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine. *Brasileira de Farmacognosia*, 24(5), 591 - 608.
- J Manosroi, P. D. (2006). Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P38 cell lines. *Cancer lett* , 114 - 120.
- J. V. Kamath, N. R. (2008). *Psidium guajava* L: A review. *International Journal of Green Pharmacy*, 8 - 12.
- Johnston, G., Chebib, M., Duke, R., Fernández, S. P., Hanrahan, J. R., & Mewett, T. H. (2009). Herbal Products and GABA Receptors. *Encyclopedia of Neuroscience*, 1095-1101.
- Joseph, L., George, M., & Mathews, G. S. (21 de Enero de 2016). Phytochemical investigation on various parts of *Psidium guajava*. *ANNALS OF PLANT SCIENCES*, 1265-1268. Recuperado el 12 de Agosto de 2018
- Juana Benedía, Á. G. (Enero de 2007). Ansiedad. *ELSEVIER*, 21(01). Recuperado el 12 de Agosto de 2018
- Lader, M. (2015). *Generalized Anxiety Disorder*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Lowery-Gionta, Emily G; DiBerto, Jeffrey; Mazzone, Christopher M & Kash, Thomas Louis. (2018). GABA neurons of the ventral periaqueductal gray area modulate behaviors associated with anxiety and conditioned fear. *Brain Structure and Function* , 1, 1 - 13.
- Mathesius, U. (2018). Flavonoid Functions in Plants and Their Interactions with Other Organisms. *Plants (Basel Switzerland)*, 30.



- Matsuo N, H. K. (1994). Identification of (+) gallocatechin as a bioantimutagenic compound in Psidium guava leaves. *Phytochemistry*, 1027-1029.
- Memariani, Z., Gorji, N., & Farzaei, R. M. (2020). Phytonutrients in Food - Chapter Two - Traditional uses. *Woodhead Publishing*, 23 - 66.
- MsC. Ana López Vantour, M. A. (11 de Enero de 2010). *BVS Cuba*. Recuperado el 24 de Julio de 2018, de Uso y abuso de las benzodiazepinas:  
[http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol\\_14\\_4\\_10/san17410.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol_14_4_10/san17410.htm)
- Mumper, J. D. (s.f.). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *molecules ISSN 1420-3049*, 7313-7352.
- Murphy, D. (2017). Alkaloids. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition)*, II, 118 - 124.
- Nacional, C. d. (2016). Diagnostico y Tratamiento de los Trastornos de la Ansiedad en Adulto . *Guia de Práctica Clínica - Mexico*, 1, 1 - 15.
- Ojewole, J. (2005). Hypoglycemic and hipotensive effects of Psidium guajava leaf aqueous extracts. *Methods Find Clin Pharmacol*, 25, 689 - 695.
- OMS. (2019). *Organizacion Mundial de la Salud*. Recuperado el 08 de noviembre de 2019, de [https://www.who.int/mental\\_health/management/es/](https://www.who.int/mental_health/management/es/)
- Peng, W.-H., Wu, C.-R., Chen, C.-S., Chen, C.-F., & Hsieh, Z.-C. L.-T. (2005). Anxiolytic effect of berberine on exploratory activity of the mouse in two experimental anxiety models: Interaction with drugs acting at 5-HT receptors. *Life Sciences*, 75, 2451 – 2462.
- PÉREZ-SÁNCHEZ, L., PARRA-JIMÉNEZ, E. L., & ESPINOSA-PARRA, I. M. (2014). *Introduccion a la Psicoterapia*. Mexico: ECORFAN.
- Polanco, L. A., Vargas-Irwin, C., & Góngora, M. E. (2011). Animal models: A review from three tests used in anxiety. *Suma Psicológica*, 18(2), 141 - 148.
- Pultrini, A. d., Galindo, L. A., & Costa, M. (2005). Effects of the essential oil from Citrus aurantium L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sciences*, 78, 1720 – 1725.
- Quercetina. (s.f.). *La quercetina: una estrella en ascenso de Nervios, Inmunidad y Metabolismo*. Recuperado el 12 de Agosto de 2018, de <http://conocimiento.articlesask.com/2health/2naturalhealth/1002209891.html>
- REJÓN-ORANTES, J. D., PERDOMO, D. P., & ROLDÁN, G. (2011). Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolíticade sustancias extraídas de plantas. *Redalyc*, 52(1), 78 - 89.
- Ritchie, H., & Roser, M. (2018). *Mental Health*. Recuperado el 08 de noviembre de 2019, de <https://ourworldindata.org/mental-health>

- Rosa Isela García-Ríos, A. M.-P.-M.-F. (04 de Febrero de 2020). Neuropharmacology of Secondary Metabolites from Plants with Anxiolytic and Antidepressant Properties. *IntechOpen*. Obtenido de <https://www.intechopen.com/online-first/neuropharmacology-of-secondary-metabolites-from-plants-with-anxiolytic-and-antidepressant-properties>
- Rubio, T. V. (Mayo de 2016). *Universidad de Jaén*. Recuperado el 24 de Julio de 2018, de Descripción de terapias alternativas para los trastornos de ansiedad.
- Shruthi, S. D., AdhikariRoshan, & SajjekhanSunita, S. S. (2013). A REVIEW ON THE MEDICINAL PLANT PSIDIUM GUAJAVALINN. (MYRTACEAE). *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 3, 162 -168.
- Sierra, J. C., Ortega, V., & Zubeidat, I. (2003). Ansiedad, angustia y estrés: tres conceptos a diferenciar. *REVISTA MAL-ESTAR E SUBJETIVIDADE / FORTALEZA*, III(1), 10 - 59.
- Sklenár, P., & Balslev, H. (2005). Superpáramo plant species diversity and phytogeography in Ecuador. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 200, 416-433.
- Tinitana, F., Rios, M., Romero-Benavides, J. C., & Pardo-de-Santayana, M. d. (2016). Medicinal plants sold at traditional markets in southern Ecuador. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 29, 1 - 8.
- Torres, C., Otero, P., Bustamante, B., Blanco, V., & Vázquez, O. D. (2017). Mental Health Problems and Related Factors in Ecuadorian College Students. *Int J Environ Res Public Health*, 14, 1- 13.
- Turismo, M. d. (2013). *ECUADOR: REGIONES NATURALES*. Recuperado el 24 de Julio de 2018, de <https://ecuador1b229.wordpress.com/tag/turismo/>
- UNID. (2016). Tamizaje o screening fitoquímico. Lima.
- Vargas, C., & Góngora, M. E. (Diciembre de 2011). *Scielo*. Recuperado el 24 de Julio de 2018, de MoDelos aniMales: Una revisión DesDe tres prUeBas UtilizaDas en ansieDaD: <http://www.scielo.org.co/pdf/sumps/v18n2/v18n2a11.pdf>
- Vignera, M. (s.f.). *Ansiedad en mujeres, ¿Porqué la sufren más que los hombres?* Recuperado el 24 de Julio de 2018, de ANSIEDAD EN MUJERES: <http://mirandavignera.es/ansiedad-en-mujeres/>
- Villarroel, B. (2008). *Clínica de la Ansiedad*. Recuperado el 24 de Julio de 2018, de Psicólogos especialistas en el tratamiento de la ansiedad: <https://clinicadeansiedad.com/problemas/introduccion/causas-de-la-ansiedad-origen-y-mantenimiento/>

Vindel, C. (24 de Diciembre de 2011). *Sociedad Española para el Estudio de la Ansiedad y el Estrés*. Recuperado el 24 de 07 de 2018, de Salud:  
<http://www.ansiedadystres.org/salud>

## ANEXOS

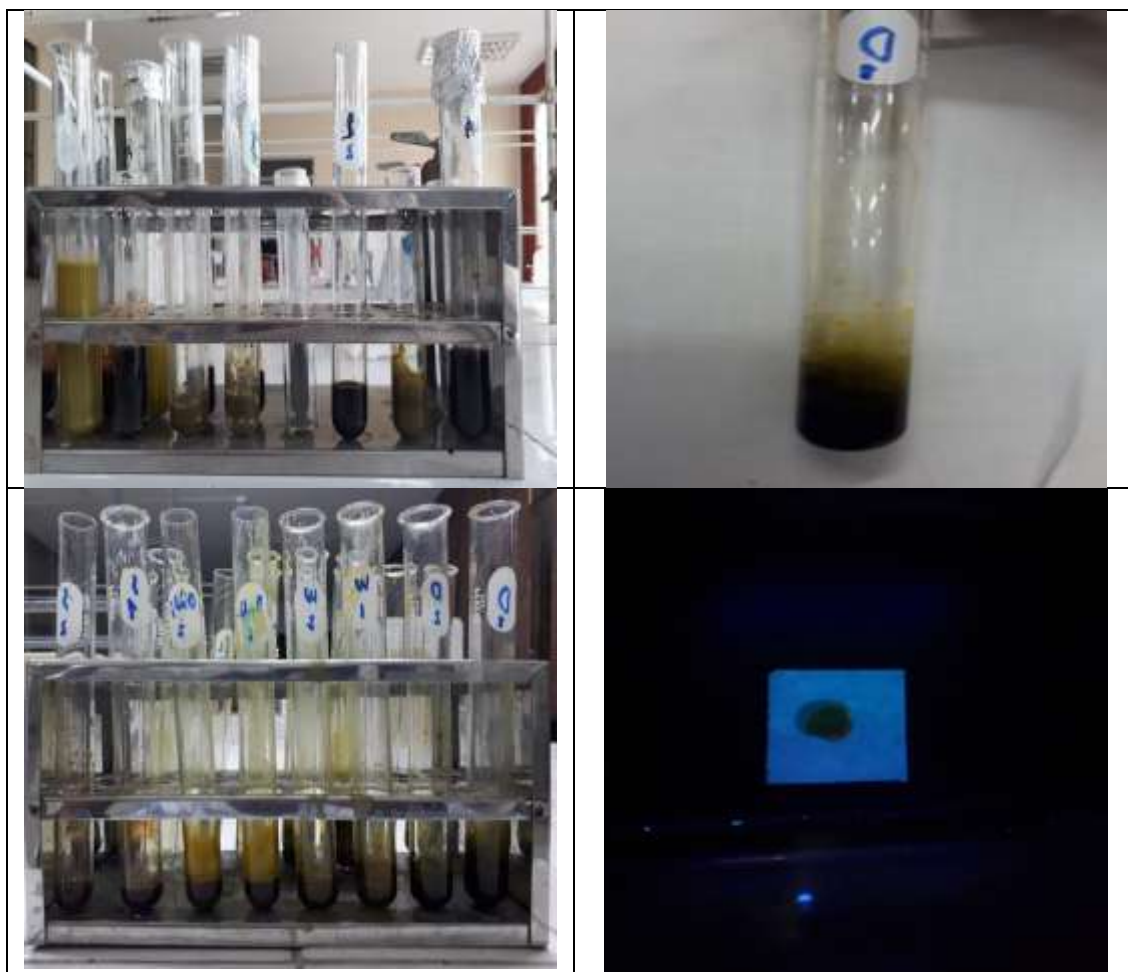
### ANEXO A: Preparación de la droga cruda



### ANEXO B: Control de calidad de la droga cruda



### ANEXO C: Tamizaje fitoquímico



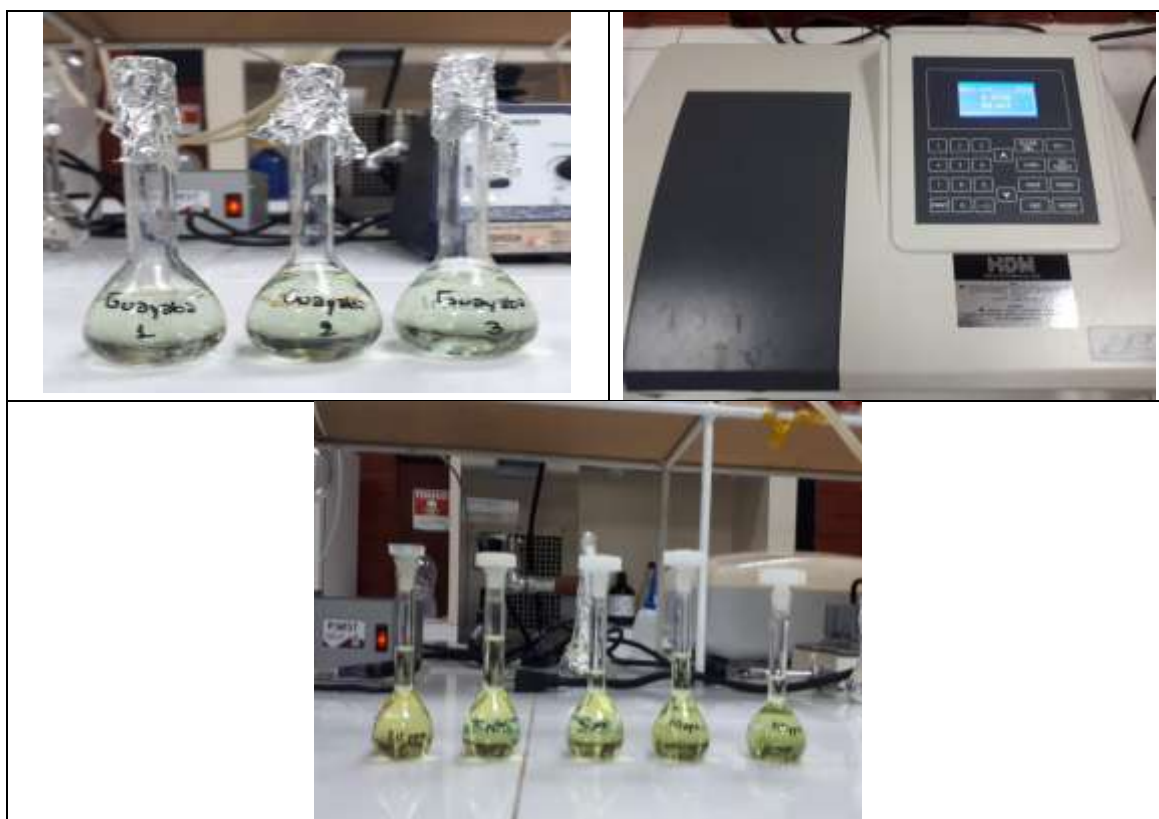
### ANEXO D: Control de calidad del extracto hidroalcohólico



**ANEXO E: Concentración del extracto**



**ANEXO F: Cuantificación de flavonoides y fenoles totales**



**ANEXO G:** Animales de experimentación



**ANEXO H:** Reconstitución del extracto seco con propilenglicol al 15%



**ANEXO I:** Manipulación y administración de los extractos en los animales de experimentación



**ANEXO J:** Equipos utilizados para determinar la actividad ansiolítica









ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS PARA EL  
APRENDIZAJE Y LA INVESTIGACIÓN



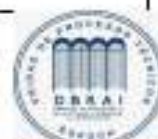
UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS  
REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 12/11/2020

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)</b>
Nombres - Apellidos: Sebastián Patricio Pachacama Huilca
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
Facultad: Ciencias
Carrera: Bioquímica y Farmacia
Título a optar: Bioquímico Farmacéutico
E. Analista de Biblioteca responsable: Lic. Luis Caminos Vargas Mgs.



LUIS ALBERTO  
CAMINOS  
VARGAS



0305-DBRAI-UPT-2020