



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DE LA
COMBINACIÓN DE EXTRACTOS DE LAVANDA (*Lavandula sp*) Y
NARANJA (*Citrus reticulata*) EN RATONES (*Mus musculus*)”**

Trabajo de Titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: ALISON GABRIELA ALBUJA REMACHE

DIRECTORA: BQF. GISELA ALEXANDRA PILCO BONILLA, MS.c

Riobamba – Ecuador

2022

© 2022, Alison Gabriela Albuja Remache

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

Yo, ALISON GABRIELA ALBUJA REMACHE, declaro que el presente Trabajo de Titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora 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, 14 de noviembre del 2022

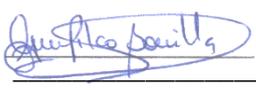
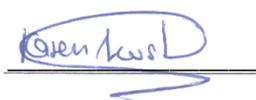


Alison Gabriela Albuja Remache

C.I: 060394383-8

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; Tipo: Trabajo Experimental, “**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DE LA COMBINACIÓN DE EXTRACTOS DE LAVANDA (*Lavandula sp*) Y NARANJA (*Citrus reticulata*) EN RATONES (*Mus musculus*)**”, realizado por la señorita **ALISON GABRIELA ALBUJA REMACHE**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
BQF. Byron Stalin Rojas Oviedo M.Sc PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2022-11-14
BQF. Gisela Alexandra Pilco Bonilla, M.Sc DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		2022-11-14
Lic. Karen Lisseth Acosta León, M.Sc MIEMBRO DEL TRIBUNAL		2022-11-14

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación se lo dedico a Dios y la Virgen Santísima por darme la fuerza y sabiduría para concluir mi etapa académica.

A mi madre María Alexandra Remache, a mi padre Javier Albuja por brindarme todo su apoyo tanto económico y moral durante mi vida universitaria, por todos sus consejos y a mi hermana Luciana por siempre estar a mi lado en todo momento.

A mi esposo Santiago Paredes y mis hijos Matheo y Leandro, por ser mi motor, y fuerza que he necesitado para concluir con mis estudios.

A mi abuelita Dorita Chuquimarca por ser un ejemplo de superación y perseverancia y a mi ángel que me cuida desde el cielo mi abuelito Jorge Remache.

A mis tíos (Mauro, Adriana, Jorge y Diego) que fueron un soporte importante durante mi vida.

A mis amigas que me han dado palabras de aliento para seguir adelante con mis estudios y culminar mi carrera.

Alison

AGRADECIMIENTO

A Dios por ayudarme en todo momento, por permitirme cumplir con una meta más en mi vida, por darme la fuerza y la sabiduría para culminar mi carrera.

A mi tutora BQF. Gisela Pilco por bríndame su apoyo para lograr concluir con el presente trabajo de titulación de una manera correcta.

Al BQF. Benjamín Román por compartir todos sus conocimientos para la realización del presente trabajo de titulación, y por el apoyo brindado durante los meses de trabajo experimental.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo especialmente a la escuela de Bioquímica y Farmacia por acogerme durante mi etapa académica, hasta finalizar con mi Trabajo de Titulación.

Alison

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIA	6
1.1. Ansiedad	6
1.1.1. Causas de la Ansiedad	6
1.1.2. Factores de riesgo	6
1.1.2.1. Factores Genéticos	7
1.1.2.2. Factores perinatales	7
1.1.2.3. Factores durante la primera infancia	7
1.1.2.4. Factores de abuso de sustancia	7
1.1.3. El cerebro como productor de ansiedad	7
1.1.4. Neurobiología de la ansiedad	8
1.1.5. Estructuras neuroanatómicas de la ansiedad	8
1.1.5.1. Amígdala	8
1.1.5.2. Locus ceruleus	8
1.1.5.3. Tálamo	8
1.1.5.4. Hipotálamo	9
1.1.5.5. Sustancia gris periacueductal	9
1.1.5.6. Hipocampo	9
1.1.5.7. Corteza orbitofrontal	9
1.1.6. Ansiedad en relación con el insomnio, la depresión y el dolor crónico	9
1.1.7. Clasificación de la ansiedad	10
1.1.7.1. Trastorno de ansiedad por separación	10
1.1.7.2. Mutismo selectivo	10
1.1.7.3. Fobia específica	10
1.1.7.4. Trastorno ansioso social	10

1.1.7.5.	<i>Trastorno de angustia</i>	10
1.1.7.6.	<i>Agorafobia</i>	11
1.1.7.7.	<i>Trastorno de ansiedad generalizada</i>	11
1.1.7.8.	<i>Trastorno de ansiedad producido por sustancias/medicación</i>	11
1.1.7.9.	<i>Trastornos de ansiedad especificados</i>	11
1.1.8.	<i>Síntomas generales de la ansiedad</i>	11
1.1.9.	<i>Tratamiento de la ansiedad</i>	11
1.1.9.1.	<i>Terapia cognitivo conductual (TCC)</i>	12
1.1.9.2.	<i>Terapia de aceptación y compromiso</i>	12
1.1.9.3.	<i>Biorretroalimentación</i>	12
1.1.10.	<i>Farmacoterapia usada para la ansiedad</i>	12
1.2.	Benzodiacepinas	13
1.2.1.	<i>Clasificación de las benzodiacepinas según la vida media</i>	13
1.2.2.	<i>Mecanismo de acción de benzodiacepinas</i>	13
1.3.	Experimentación animal	14
1.3.1.	<i>Normas éticas en el manejo de los animales</i>	14
1.3.2.	<i>Ratón</i>	15
1.3.3.	<i>Ratón <i>Mus musculus</i></i>	15
1.3.3.1.	<i>Descripción: rasgos generales de la especie</i>	16
1.3.3.2.	<i>Clasificación científica de la especie</i>	16
1.3.4.	<i>Aspectos bioéticos y legales</i>	16
1.3.5.	<i>Modelos experimentales, test comportamentales en animales</i>	17
1.3.5.1.	<i>Cuarto claro oscuro</i>	18
1.3.5.2.	<i>Campo abierto</i>	18
1.3.5.3.	<i>Laberinto en cruz elevada</i>	19
1.3.6.	<i>Lavanda (<i>Lavandula sp</i>)</i>	19
1.3.6.1.	<i>Descripción de la planta</i>	19
1.3.6.2.	<i>Clasificación taxonómica</i>	20
1.3.6.3.	<i>Hábitat y distribución</i>	20
1.3.6.4.	<i>Composición química</i>	20
1.3.6.5.	<i>Usos comunes de la lavanda (<i>Lavandula sp</i>)</i>	20
1.3.7.	<i>Naranja (<i>Citrus reticulata</i>)</i>	21
1.3.7.1.	<i>Descripción de la planta</i>	21
1.3.7.2.	<i>Clasificación taxonómica</i>	22
1.3.7.3.	<i>Hábitat y distribución</i>	22
1.3.7.4.	<i>Composición química</i>	22
1.3.7.5.	<i>Usos comunes de la naranja (<i>Citrus reticulata</i>)</i>	23

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	24
2.1.	Lugar de la investigación	24
2.2.	Tipo y diseño de la investigación	24
2.2.1.	<i>Tipo de investigación</i>	24
2.2.2.	<i>Diseño de la investigación</i>	24
2.3.	Población de estudio	25
2.3.1.	<i>Población de la variable dependiente</i>	25
2.3.2.	<i>Población de la variable independiente</i>	25
2.4.	Técnica de recolección de datos	26
2.5.	Equipos, materiales y reactivos	26
2.5.1.	<i>Material vegetal</i>	26
2.5.2.	<i>Material biológico</i>	26
2.5.3.	<i>Lista de equipos, materiales y reactivos utilizados en el laboratorio</i>	26
2.6.	Técnicas y métodos	28
2.6.1.	<i>Recolección de plantas e identificación botánica</i>	28
2.6.1.1.	<i>Obtención de la muestra seca de Lavandula sp y Citrus reticulata</i>	29
2.6.2.	<i>Análisis fisicoquímico</i>	30
2.6.2.1.	<i>Determinación de humedad (Pérdida por desecación - Método gravimétrico)</i>	30
2.6.2.2.	<i>Determinación de cenizas totales</i>	31
2.6.2.3.	<i>Determinación de cenizas solubles en agua</i>	31
2.6.2.4.	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i>	32
2.6.3.	<i>Tamizaje o screening fitoquímico</i>	34
2.6.3.1.	<i>Procedimiento para el tamizaje fitoquímico</i>	34
2.6.4.	<i>Preparación de los extractos hidroalcohólicos de lavanda (Lavandula sp) y naranja (Citrus reticulata)</i>	36
2.6.5.	<i>Control de calidad de los extractos hidroalcohólicos</i>	37
2.6.5.1.	<i>Requisitos organolépticos</i>	37
2.6.5.2.	<i>Determinación de densidad relativa</i>	38
2.6.5.3.	<i>Determinación del índice de refracción</i>	38
2.6.5.4.	<i>Determinación de pH</i>	38
2.6.5.5.	<i>Determinación de sólidos totales</i>	38
2.6.6.	<i>Cuantificación de Flavonoides totales (Método de AlCl₃)</i>	39
2.6.7.	<i>Cuantificación de fenoles totales</i>	39
2.6.8.	<i>Actividad ansiolítica</i>	39
2.6.8.1.	<i>Equipo Electrónico de medición Laberinto en Cruz Elevado</i>	40

2.6.8.2.	<i>Equipo Electrónico de medición cuatro claro-oscuro</i>	42
2.6.8.3.	<i>Equipo Electrónico de medición campo abierto</i>	43
2.6.9.	<i>Procedimiento de uso de equipos</i>	45
2.6.10.	<i>Análisis estadístico</i>	46

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS	49
3.1.	Control de calidad de la droga vegetal cruda	49
3.1.1.	<i>Determinación de humedad</i>	49
3.1.2.	<i>Determinación de cenizas</i>	49
3.2.	Tamizaje fitoquímico	50
3.3.	Control de calidad del extracto hidroalcohólico	52
3.4.	Cuantificación de flavonoides	53
3.5.	Cuantificación de compuestos fenólicos	53
3.6.	Análisis de la actividad ansiolítica	54
3.6.1.	<i>Equipo electrónico de medición campo Claro - Oscuro</i>	54
3.6.1.1.	<i>Prueba de normalidad</i>	54
3.6.1.2.	<i>Prueba de homogeneidad de varianzas</i>	55
3.6.1.3.	<i>Prueba de ANOVA de un factor</i>	56
3.6.1.4.	<i>Comparaciones múltiples del método Tukey</i>	57
3.6.2.	<i>Equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado</i>	61
3.6.2.1.	<i>Prueba de normalidad</i>	61
3.6.2.2.	<i>Prueba de homogeneidad de varianzas</i>	63
3.6.2.3.	<i>Prueba de ANOVA de un factor</i>	64
3.6.2.4.	<i>Comparaciones múltiples a través del Método de Tukey</i>	65
3.6.3.	<i>Equipo electrónico de medición Campo abierto</i>	71
3.6.3.1.	<i>Prueba de normalidad</i>	71
3.6.3.2.	<i>Prueba de homogeneidad de varianzas</i>	72
3.6.3.3.	<i>Prueba de ANOVA de un factor</i>	74
3.6.3.4.	<i>Comparaciones múltiples a través del método Tukey</i>	75
	CONCLUSIONES	82
	RECOMENDACIONES	83
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Clasificación de benzodiazepinas según la vida media	13
Tabla 1-2:	Control de calidad de materia prima	26
Tabla 2-2:	Tamizaje Fitoquímico	27
Tabla 3-2:	Control de Calidad del Extracto Hidroalcohólico	27
Tabla 4-2:	Obtención del extracto concentrado	27
Tabla 5-2:	Cuantificación de Flavonoides y Fenoles.....	28
Tabla 6-2:	Evaluación de la Actividad Ansiolítica	28
Tabla 7-2:	Taxonomía de las especies vegetales	29
Tabla 8-2:	Tratamientos, dosis, concentración y códigos de los grupos de investigación ..	40
Tabla 9-2:	Parámetros de evaluación de la actividad ansiolítica en el equipo “laberinto en cruz elevado”	41
Tabla 10-2:	Parámetros de evaluación de la actividad ansiolítica en cuarto claro - oscuro ..	43
Tabla 11-2:	Parámetros de evaluación de la actividad ansiolítica en campo abierto	45
Tabla 1-3:	Determinación de humedad	49
Tabla 2-3:	Resultado de cenizas totales, cenizas solubles agua e insolubles en ácido clorhídrico.....	49
Tabla 3-3:	Resultados de ensayo fitoquímicos de extractos etéreo, alcohólico y acuoso....	50
Tabla 4-3:	Parámetros organolépticos	52
Tabla 5-3:	Parámetros físicos – químicos.....	52
Tabla 6-3:	Cuantificación de flavonoides.....	53
Tabla 7-3:	Cuantificación de compuestos fenólicos	53
Tabla 8-3:	Prueba de normalidad mediante la prueba de Lilliefors para el equipo de medición campo claro – oscuro.	54
Tabla 9-3:	Prueba de homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene para el equipo electrónico de medición campo claro – oscuro.	55
Tabla 10-3:	Prueba de ANOVA de un factor para el equipo electrónico de medición campo claro-oscuro.	56
Tabla 11-3:	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey para el equipo electrónico de medición campo claro – oscuro. Parámetro número de cruces claro – oscuro. .	57
Tabla 12-3:	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey para el equipo electrónico de medición campo claro – oscuro. Parámetro tiempo cuarto claro.	58
Tabla 13-3:	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey para el equipo electrónico de medición campo claro – oscuro. Parámetro tiempo cuarto oscuro.	59

Tabla 14-3:	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey para el equipo electrónico de medición campo claro – oscuro. Parámetro distancia recorrida.	60
Tabla 15-3:	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey para el equipo electrónico de medición campo claro – oscuro. Parámetro velocidad media.	60
Tabla 16-3:	Prueba de normalidad mediante la prueba de Lilliefors para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado.	61
Tabla 17-3:	Prueba de homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene para el equipo electrónico de medición en cruz elevado.	63
Tabla 18-3:	Prueba de ANOVA de un factor para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado.	64
Tabla 19-3:	Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado. Parámetro entradas en brazos cerrados.	65
Tabla 20-3:	Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado. Parámetro entradas en brazos abiertos.	66
Tabla 21-3:	Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado. Parámetro tiempo en brazos cerrados.	67
Tabla 22-3:	Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado. Parámetro tiempo en brazos abiertos.	68
Tabla 23-3:	Prueba de comparaciones múltiples por método Tukey para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado. Parámetro tiempo en el centro.	68
Tabla 24-3:	Prueba de comparaciones múltiples por método Tukey para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado. Parámetro distancia recorrida.	69
Tabla 25-3:	Prueba de comparaciones múltiples por método Tukey para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado. Parámetro velocidad media.	70
Tabla 26-3:	Prueba de normalidad mediante la prueba Lilliefors para el equipo electrónico de medición campo abierto.	71
Tabla 27-3:	Prueba de homogeneidad de varianzas mediante el Test de Levene para el equipo electrónico de medición campo abierto.	72
Tabla 28-3:	Prueba de ANOVA de un factor para el equipo electrónico medición campo abierto.	74
Tabla 29-3:	Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto. Parámetro distancia recorrida.	75

Tabla 30-3:	Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto. Parámetro velocidad media.76
Tabla 31-3:	Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto. Parámetro número de defecaciones.77
Tabla 32-3:	Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto. Parámetro número de elevaciones.77
Tabla 33-3:	Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto. Parámetro tiempo total en esquinas.78
Tabla 34-3:	Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto. Parámetro tiempo total en lados.79
Tabla 35-3:	Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto. Parámetro tiempo total en el interior. .80
Tabla 36-3:	Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto. Parámetro tiempo total en el centro. ...80

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-1:	Ratón <i>Mus musculus</i>	16
Ilustración 2-1:	Lavanda (<i>Lavandula sp</i>).....	19
Ilustración 3-1:	Naranja (<i>Citrus reticulata</i>).....	21
Ilustración 1-2:	Lugar de recolección lavada (<i>Lavandula sp</i>) y naranja (<i>Citrus reticulata</i>) ...	25
Ilustración 2-2:	Diagrama de obtención de la muestra seca	29
Ilustración 3-2:	Diagrama de determinación de humedad	30
Ilustración 4-2:	Diagrama de determinación de cenizas totales.....	31
Ilustración 5-2:	Diagrama de determinación de cenizas solubles en agua	32
Ilustración 6-2:	Diagrama de determinación de cenizas insolubles en agua	33
Ilustración 7-2:	Diagrama de procedimientos para el tamizaje fitoquímico	34
Ilustración 8-2:	Diagrama de ensayos en extracto etéreo	35
Ilustración 9-2:	Diagrama de los ensayos realizados en el extracto alcohólico	35
Ilustración 10-2:	Diagrama de los ensayos del extracto acuoso	36
Ilustración 11-2:	Diagrama de obtención de los extractos hidroalcohólicos.....	37
Ilustración 12-2:	Equipo electrónico laberinto en cruz elevado	40
Ilustración 13-2:	Teste de evaluación laberinto en cruz elevado	41
Ilustración 14-2:	Equipo electrónico de medición campo claro – oscuro.....	42
Ilustración 15-2:	Test de evaluación campo claro – oscuro.....	43
Ilustración 16-2:	Equipo electrónico de medición campo abierto.....	44
Ilustración 17-2:	Test de evaluación de campo abierto	44
Ilustración 18-2:	Procedimiento del uso de los equipos para los test comportamentales	45
Ilustración 19-2:	Supuestos estadísticos usados para la investigación.....	46
Ilustración 20-2:	Datos de la prueba de Homogeneidad de varianzas.	47
Ilustración 21-2:	Parámetro de la prueba de homogeneidad de varianza, entradas en brazos abiertos.	47
Ilustración 22-2:	Parámetro para la prueba de ANOVA, tiempo total en las esquinas.	48
Ilustración 23-2:	Parámetro de comparación múltiple por el método de Tukey	48

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL
- ANEXO B:** SECADO Y MOLIENDA DEL MATERIAL VEGETAL
- ANEXO C:** DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y CENIZAS TOTALES
- ANEXO D:** TAMIZAJE FITOQUÍMICO
- ANEXO E:** CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO
- ANEXO F:** CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO
- ANEXO G:** LIOFILIZACIÓN
- ANEXO H:** CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES Y FLAVONOIDES TOTALES
- ANEXO I:** AMBIENTACIÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN
RATONES (MUS MUSCULUS)
- ANEXO J:** ADMINISTRACIÓN DE SOLUCIONES EN LOS ANIMALES DE
EXPERIMENTACIÓN
- ANEXO K:** EQUIPOS UTILIZADOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA
- ANEXO L:** SOFTWARE UTILIZADO PARA EL PROCESAMIENTO DE IMÁGENES Y
DATOS
- ANEXO M:** IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LAVANDULA SP Y CITRUS
RETICULATA

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

GABA	Ácido gaba amino butírico
OPS	Organización Panamericana de la Salud
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
Ho	Hipótesis nula
Ha	Hipótesis alternativa
mg	Miligramo
kg	Kilogramo
CCO	Campo claro - oscuro
LCE	Laberinto en cruz elevado
CA	Campo abierto

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo determinar la actividad ansiolítica de la combinación de los extractos de lavanda (*Lavandula sp*) y naranja (*Citrus reticulata*) en ratones (*Mus musculus*). El estudio fue cuasiexperimental y prospectivo, se recolectó el material vegetal y se procedió a la preparación de los extractos acuoso, etéreo, alcohólico e hidroalcohólico para los cuales se pesó 50 g de material vegetal seco y triturado, una vez obtenidos los extractos se realizó un análisis de tamizaje fitoquímico. Para obtener las concentraciones de 150 ppm, 200 ppm y 250 ppm, se liofilizaron los extractos de las muestras vegetales, así mismo, para determinar la actividad ansiolítica se usaron 5 grupos de estudio que constaron de 6 ratones, se trabajó con el blanco, el control y con 3 diferentes concentraciones de dosificación, al grupo control se le administró clonazepam con vehículo de propilenglicol al 15%, al blanco no se le administró ninguna solución. Además, para el procesamiento de datos se usó el software ANXIOLITIC LAB en los diferentes test comportamentales: campo claro – oscuro (CCO), laberinto en cruz elevado (LCE) y campo abierto (CA), por otra parte, se generó la base de datos en la hoja de cálculo de EXCEL. Los resultados del tamizaje fitoquímico mostraron como principales metabolitos a los alcaloides y los terpenos, con respecto al resultado del efecto ansiolítico de las diferentes concentraciones se concluyó que la tercera concentración posee una actividad ansiolítica similar a la del clonazepam. Se recomienda que se realice un estudio comparativo con las mismas especies de manera individual.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <FARMACIA>, <ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA>, <CLONAZEPAM>, <EXTRACTO HIDROALCÓHOLICO>, <LAVANDA (*Lavandula sp*)>, <NARANJA (*Citrus reticulata*)>, <CAMPO CLARO - OSCURO>.



2311-DBRA-UTP-2022

ABSTRACT

The aim of this research was to determine the anxiolytic activity of the combination of lavender (*Lavandula* sp) and orange (*Citrus reticulata*) extracts in mice (*Mus musculus*). The study was quasi-experimental and prospective, the plant material was collected and the aqueous, ethereal, alcoholic and hydroalcoholic extracts were prepared by weighing 50g of dried and crushed plant material, and once the extracts were obtained, a phytochemical screening analysis was performed. To obtain the concentrations of 150 ppm, 200 ppm and 250 ppm, the extracts of the plant samples were lyophilized, likewise, to determine the anxiolytic activity, 5 study groups consisting of 6 mice were used, working with the blank group, the control group and with 3 different dose concentrations, the control group was administered clonazepam with 15% propylene glycol as vehicle, the blank was not administered any solution. In addition, the ANXIOLITIC LAB software was used for data processing in the different behavioral tests: light-dark field (LDF), elevated cross maze (ECM) and open-field (OF), on the other hand, the database was generated in EXCEL spreadsheet. The results of the phytochemical screening showed alkaloids and terpenes as main metabolites, with respect to the result of the anxiolytic effect of the different concentrations it was concluded that the third concentration has an anxiolytic activity similar to clonazepam. It is recommended that a comparative study be carried out with the same species individually.

Keywords: <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACY>, <ANXIOLITIC ACTIVITY>, <HYDROALCOHOLIC EXTRACT>, <LAVENDER (*Lavandula* sp)>, <ORANGE (*Citrus reticulata*)>, <LIGHT-DARK FIELD>.



Lic. Edison Hernán Salazar Calderón MS.c

C.I. 0603184698

INTRODUCCIÓN

Los principales problemas de salud pública en la actualidad son los trastornos mentales, entre estos el de mayor prevalencia es la ansiedad que puede presentarse en cualquier grupo etario niños, adolescentes y adultos (Montserrat Macías Carballo, 2019).

Actualmente, los últimos conceptos proponen a la ansiedad como un conjunto de comportamientos que son clasificados según su severidad, en las diferentes escalas ya establecidas en la mayoría de países conocidas como: ansiedad leve, asociada a tensiones de la vida diaria; ansiedad moderada, en la cual la persona se centra solo en las preocupaciones inmediatas y, ansiedad grave como la que puede generar síntomas somáticos o psiquiátricos que limitan la función diaria, y la angustia que ocasiona terror, miedo y en general genera fobias (Sarudiansky, 2013).

Datos estadísticos concluyeron que aproximadamente 264 millones personas padecen trastornos de ansiedad. Esta cantidad representa el 3,6 % de la población mundial, Alrededor de 4.6% de mujeres padecen de ansiedad, en comparación con 2.6% de hombres, cifras que van en aumento con el pasar de los días (OMS, 2017).

En Ecuador es la segunda enfermedad mental más importante y ocasiona grandes problemas somáticos, llegando hasta el 2018 al 33,4% (OPS y OMS, 2018). Lo que se ha visto incrementado por la pandemia del 2020, hasta en aproximadamente un 300% (Tusev, et al., 2020).

En cuanto al tratamiento las benzodiacepinas son medicamentos de primera línea para el tratamiento de trastornos de ansiedad, estas actúan reduciendo la tensión subjetiva y los síntomas objetivos. También se pueden encontrar otros grupos como los antidepresivos o sustancias químicas nuevas.

Asimismo, existen extensas investigaciones y documentaciones relacionadas con el uso de las plantas como tratamiento alternativo para problemas psicológicos aplicados junto con terapia conductual. La OMS subraya que de los 119 fármacos obtenidos a partir de plantas el 74% son utilizados en la medicina moderna (Casamayor, et al., 2014).

La ansiedad, la depresión y el estrés fueron enfermedades de salud mental que durante la pandemia del COVID-19, fueron en aumento en las diferentes poblaciones, la falta de información provocó en las personas un pánico generalizado desde el inicio, por lo mismo cada familia buscó nuevas alternativas para controlar los signos y síntomas de estas enfermedades (Prieto & Aguirre., 2020).

En la investigación realizada por Gimena Pérez y María Eva González sobre “Las plantas medicinales contra la ansiedad”, realizada en el 2015, hacen referencia que a finales del 2012 se realizó un estudio con una muestra de 1525 artículos incluidos en los buscadores de MEDLINE y PubMed, se enfocaron en 53 estudios de extractos de diferentes especies vegetales de los cuales 32 tienen evidencia preclínica y 21 pruebas clínicas. Las especies vegetales más importantes para investigaciones a nivel mundial son: *Hypericum perforatum*, *Piper methysticum*, *Matricaria recutita*, *Ginkgo biloba*, *Passiflora incarnata* y *Scutellaria lateriflora*, (Gimena Perez, 2015).

La lavanda (*Lavandula sp*) es una de las especies vegetales que desde tiempos antiguos se ha usado para tratar algunas de las afecciones del sistema nervioso central como la ansiedad, insomnio y otros síntomas (R, 2012. p. 56).

En el 2012 se publicó un artículo de revisión, en el cual se analizaron aproximadamente 440 artículos, aunque solo 15 de ellos fueron destacados con un total de 1565 participantes, este análisis se realiza en un periodo de 1995 a 2010, los resultados de estos artículos fueron positivos para *Lavandula sp*, principalmente los que se administraron por vía oral (R, 2012. p. 56).

La investigación realizada por Woelk y Schläfe publicada en el 2010 acerca de la actividad ansiolítica de lavanda (*Lavandula sp*) administrada por vía oral comparándola con el lorazepam un ansiolítico muy usado en los trastornos de ansiedad, para el cual se usó extracto de lavanda (*Lavandula sp*) 80mg/día y lorazepam 0,5mg/día, estos grupos no presentaron una diferencia significativa, lo que se evidenció fue la ausencia de efectos sedantes de *Lavandula sp*, este mismo tratamiento pero usado por más tiempo resultó eficaz para otros trastornos de la ansiedad (R, 2012. p. 56).

Existe poca información sobre investigaciones acerca de los efectos medicinales y curativos de la naranja (*Citrus reticulata*) en el sistema nervioso central, en los pocos estudios encontrados se evidencia el efecto tranquilizante y relajante, se ha observado que ayuda a contrarrestar el dolor de cabeza derivado del estrés y la ansiedad (Stampella, et al., 2018).

Las investigaciones demuestran que los metabolitos que constituyen a la naranja (*Citrus reticulata*) como fenoles, pigmentos y vitaminas ayudan a frenar los daños producidos en el sistema nervioso central resultado de una oxidación celular, elevan el estado de ánimo en personas con ansiedad y depresión (Ordoñez Gomez, 2018).

En un estudio realizado en el 2009 en pacientes pre quirúrgicos en edades que oscilan entre 15 y 60 años, aprobado por el comité de ética de la Shahrekord University of Medical Sciences, se

usaron las hojas de naranja (*Citrus reticulata*) para analizar su efecto ansiolítico, al terminar esta investigación se concluyó que estas hojas, poseen este efecto (Mahmood Akhlaghi, 2012. p. 78).

En otra investigación se usaron las hojas de naranja (*Citrus reticulata*) como tratamiento alternativo para la ansiedad, el insomnio y la epilepsia, en el que se utilizó el extracto hidroalcohólico en ratones de 35 – 45g, con dosificación oral de 0.5 o 1.0 mg/kg, el test comportamental usado fue el laberinto en cruz elevada y los resultados obtenidos fueron positivos ya que no hubo una interferencia en la coordinación motora del animal de experimentación (Rhot, 2016. p. 60).

Planteamiento del problema

La salud mental, es sin duda parte indivisible de la salud de cada ser humano, de hecho, esta aporta significativamente a la calidad de vida individual y mejora la participación social. Una de las principales alteraciones emocionales es la ansiedad, que es considerada por algunos autores como la más común de las emociones y que es parte de la respuesta emocional a diferentes situaciones estresantes de la vida cotidiana. Sin embargo, se puede volver patológica, y en un rango elevado es la más frecuente de las alteraciones psiquiátricas (Fernández, et al., 2012).

La ansiedad científicamente está definida como “un estado de agitación, zozobra, miedo e inquietud del paciente”, se considera como una emoción humana básica, dada como una reacción frente a una amenaza, de esta forma sirve de ayuda al individuo para adoptar medidas frente a situaciones de un alto nivel de estrés (Kuaik, 2019. p. 33).

Asimismo se puede crear una ansiedad patológica, que se trata de un miedo difuso, que no tiene motivación externa, centrado principalmente en “la expectación ansiosa”, caracterizado por la persona que permanece con aquella predisposición de que va a ocurrir algo malo, o no bien definido, generando apremio y malestar global del individuo, disminuyendo la calidad de sus actividades, generando fobias, llegando hasta crisis de pánico e inclusive una sensación inminente de muerte (Fernández, et al., 2012).

El desorden de ansiedad es multifactorial, por lo tanto, la investigación psicofarmacológica necesita perfeccionarse continuamente mediante el desarrollo en modelos animales para así obtener nueva información. Dentro de los aspectos éticos de la experimentación animal se debe evitar o disminuir el sufrimiento de las especies. Por norma ética general, no se deben manejar fármacos, sustancias, ni dispositivos en seres humanos sin pruebas previamente verificadas en animales que permitan suponer su seguridad e inocuidad de manera razonable (Pérez, 2014).

Los modelos animales, en esta investigación son ratones debido a las ventajas que estos representan, por ejemplo, de tasa alta de fecundidad, fácil manejo, poco espacio para el almacenamiento, razones que favorecen a la relación costo-beneficio y el monitoreo constante de una población (Granados, 2018).

Algunos estudios realizados en el extracto de lavanda (*Lavandula sp*) muestran mejoría en cuadros de insomnio y estrés, gracias a varios de sus componentes, entre los cuales se presenta: acetato de linalino, linalol y β -ocimene. entre otros, que se les atribuye efectos ansiolíticos (Marqués, 2017). En cuanto a la naranja (*Citrus reticulata*) se reconocen efectos sedantes, ansiolíticos provocados por el estrés, además son ligeramente hipnóticos por contener principalmente flavonoides, monoterpenos y fenoles (Laura & Castillo, 2017)

Justificación

La Organización Panamericana de la Salud (PAHO), dice que 4 de cada 100 personas sufren un trastorno depresivo y 3 de cada 100 padecen ansiedad, los síntomas que se presenta son inquietud, intensa excitación, extrema inseguridad, angustia, temor, preocupación y problemas para concentrarse. La ansiedad en el Ecuador representa un porcentaje similar al de Estados Unidos, donde 5 de cada 100 personas sufren de ansiedad (Loaiza, 2019)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) presenta un nuevo informe que indica que ha existido un incremento del 14.9% respecto al 2015, además se indica que Ecuador es el décimo país con casos de desórdenes de ansiedad en Latinoamérica ocupando el 4.6%, del cual las mujeres son las que presentan mayor prevalencia de ansiedad (OMS, 2017)

Para el tratamiento de la ansiedad los medicamentos usados con mayor frecuencia son los barbitúricos y las benzodiazepinas, los mismos que cumplen un papel fundamental en el sistema nervioso central (SNC), es importante mencionar que provocan efectos secundarios graves a los pacientes, entre estos se tiene la adicción, convulsiones y en casos extremos el suicidio, por esta razón se ha buscado opciones naturales, principalmente, el uso de plantas medicinales, como lavanda (*Lavandula sp*), pasiflora y azafrán, y así evitar los efectos secundarios, mejorando el estilo de vida del paciente (Marisol Hernandez, 2019. p. 67).

Un estudio doble ciego sobre la ansiedad, demostró los efectos que tiene la valeriana en comparación con una benzodiazepina, además se analizó la combinación de los dos componentes, los resultados fueron, que las benzodiazepinas redujeron tanto sensaciones físicas como subjetivas de los pacientes, mientras que la valeriana solo mejoró las sensaciones subjetivas del estrés, la

combinación no mostró una potenciación de los efectos hacia ningunos de los componentes (Wellness, 2018).

Por todos los antecedentes mencionados, la investigación buscó evaluar la actividad ansiolítica de la combinación del extracto de lavanda (*Lavandula sp.*) y naranja (*Citrus reticulata*) en ratones (*Mus musculus*), con la finalidad de proponer una alternativa para el manejo de los trastornos de ansiedad en los seres humanos, utilizando elementos naturales y minimizando los efectos secundarios.

Objetivos

General

- Evaluar la actividad ansiolítica de la combinación del extracto de lavanda (*Lavandula sp*) y hojas de naranja (*Citrus reticulata*) en ratones (*Mus musculus*).

Específicos

- Realizar el control de calidad de las especies vegetales lavanda (*Lavandula sp*) y hojas de naranja (*Citrus reticulata*).
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de los extractos obtenidos a partir de las especies vegetales *Lavandula sp* y *Citrus reticulata*.
- Identificar en los animales de experimentación la actividad ansiolítica mediante la aplicación de test comportamentales: Cuarto claro oscuro, campo abierto, y laberinto en cruz elevada.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIA

1.1. Ansiedad

Se define a la ansiedad como una emoción común que representa un estado mental, caracterizado por intranquilidad, exaltación, extrema inseguridad, inquietud, miedo constante ante situaciones cotidianas. Puede producir taquicardia, hiperventilación, sudoración y estado de letargia (Fernández, et al., 2012).

Etimológicamente el término ansiedad proviene del latín “*ANXIETAS*” que significa estado de agitación, zozobra o inquietud del estado de ánimo, se considera a la ansiedad como una estructura patológica del miedo, donde su respuesta comprende diferentes procesos entre los cuales se encuentran los cognitivos, afectivos, psicológicos y conductuales (Kuaik, 2019. p. 33).

1.1.1. Causas de la Ansiedad

Para identificar las causas de la ansiedad es necesario asumir que esta enfermedad tiene un origen multifactorial de origen biológico y genético, en el que influyen factores ambientales como el desarrollo y eventos psicológicos, así como también componentes sociales y culturales. Todos estos deben ser tomados en consideración para el diagnóstico y tratamiento, asumiendo que la ansiedad y la depresión puede ser una enfermedad mortal por el riesgo de suicidio que provoca (Schnaas, 2017. p. 65).

Los sentimientos ocasionados por la ansiedad pueden ir desde el pánico incontrolable hasta una crisis psicótica, perdiendo el contacto con la realidad lo que va a interferir con actividades cotidianas, algunos de estos síntomas pueden aparecer en la infancia, adolescencia y adultez (Book, 2021)

1.1.2. Factores de riesgo

Se agrupan en factores como: genéticos, eventos en el embarazo, eventos perinatales, primera infancia, abuso de alcohol y drogas. Los cuales producen hipersecreción crónica de cortisol, que ocasionará un daño estructural y funcional durante el desarrollo neurológico.

1.1.2.1. Factores Genéticos

Se ha encontrado que la variante s/s del alelo del gen transportador de la serotonina se vincula a un riesgo superior de adolecer depresión. Por otro lado, la depresión materna principalmente por quebrantos un año previo al parto, expone al recién nacido a sufrir de depresión durante su vida. También el uso de sustancias de abuso como tabaco, alcohol, marihuana y otros, durante el embarazo aumenta la incidencia de ansiedad y depresión (Schnaas, 2017, p. 68).

1.1.2.2. Factores perinatales

Los principales conocidos son: bajo peso al nacer, hipoxia, trauma durante el parto en el momento de nacer y daños en los primeros meses de vida, a nivel del sistema nervioso central intoxicación por plomo, infecciones, desnutrición entre otros, predisponen a la generación de la ansiedad (Schnaas, 2017, p. 89).

1.1.2.3. Factores durante la primera infancia

Como estrés temprano en los primeros 5 años de vida, tales como maltrato, abuso físico, sexual y psicológico, además algún tipo de negligencia en el cuidado; pueden generar alteraciones psicológicas y psiquiátricas serias (Schnaas, 2017, p. 98).

1.1.2.4. Factores de abuso de sustancia

El consumo de psicotrópicos y estupefacientes está muy extendido dentro de la sociedad, un historial de consumo de estimulantes como alcohol y drogas favorece la aparición de trastorno de ansiedad, que se refleja en estados de intranquilidad e irritabilidad (Schnaas, 2017).

1.1.3. El cerebro como productor de ansiedad

En una crisis de pánico debe intervenir obligatoriamente uno o varios mecanismos del sistema nervioso central, generando una alarma mediante un mecanismo fisiológico para monitorizar el estado respiratorio, de esta forma se recibe una señal errónea, interpretada como una situación de asfixia, produciendo un distrés respiratorio agudo, que en respuesta generaría hiperventilación, necesidad de ayuda y, por último, pánico. Esta alarma puede estar en relación con la hipersensibilidad de los quimiorreceptores de dióxido de carbono (Gómez, 2017. p. 46).

1.1.4. Neurobiología de la ansiedad

Se establece que existe una anatomía de las emociones donde se ha identificado al sistema límbico como el responsable de estas reacciones, es importante mencionar que este sistema neuronal es el responsable de preservar la vida a través de reacciones de lucha o huida, alimentación y actividad sexual, donde las emociones que se encuentran asociados con ansiedad, cólera, miedo y amor (Ildefonso, 2017. p. 56).

1.1.5. Estructuras neuroanatómicas de la ansiedad

1.1.5.1. Amígdala

Se establece que existe una anatomía de las emociones donde se ha identificado al sistema límbico como el responsable de estas reacciones, es importante mencionar que este sistema neuronal es el responsable de preservar la vida a través de reacciones de lucha o huida, alimentación y actividad sexual, donde las emociones que se encuentran asociados son ansiedad, cólera, miedo y amor (Ildefonso, 2017. p. 56).

1.1.5.2. Locus ceruleus

Se encuentra ubicado en el puente cerca del cuarto ventrículo, su acción está regulada por receptores GABA-benzodiacepínicos y serotoninérgicos con efecto inhibitorio y por el péptido intestinal vasoactivo (VIP), factor que libera corticotropina, sustancia P y acetilcolina con efecto activador (Ildefonso, 2017. p. 56).

Esta estructura envía referencias a la amígdala, hipocampo, hipotálamo, corteza y medula espinal, los mismos que están involucrados en el miedo y la ansiedad. Por lo que es importante para las respuestas de un cambio interno y externo (Ildefonso, 2017. p. 56).

1.1.5.3. Tálamo

Localizada en el centro del diencefalo, su función principal es canalizar los estímulos ambientales a la corteza, en situaciones de peligro envía señales a las amígdalas y si se encuentra lesionada no se presenta la reacción de miedo que se esperaría frente a un estímulo acústico (Ildefonso, 2017. p. 56).

1.1.5.4. Hipotálamo

Se encuentra ubicado rostralmente desde la región óptica hasta los cuerpos mamilares, además es el segundo componente del diencefalo, se encuentra implicada en la activación sináptica, liberación neuroendocrina y neuro-peptídica inducida por el estrés (Ildfonso, 2017. p. 56).

1.1.5.5. Sustancia gris periacueductal

Es transmitida desde la amígdala, cuando nos encontramos frente un peligro extremo, por lo que se desarrolla un comportamiento defensivo a través de la sustancia periacueductal lateral, mientras que frente a un peligro menor provoca una sensación de congelamiento esto se da a través de la sustancia gris periacueductal ventrolateral (Ildfonso, 2017. p. 56).

1.1.5.6. Hipocampo

Este sistema presenta estructuras límbicas y áreas sensoriales corticales que van a tener una alta densidad en los receptores 5HT-1A, por ello son fundamentales para controlar la ansiedad ya que los receptores agonistas (buspirona) logran este efecto (Ildfonso, 2017. p. 56).

1.1.5.7. Corteza orbitofrontal

Esta estructura capta información sensorial y en conjunto con las estructuras límbicas son fundamentales para la interpretación de los eventos emocionalmente significativos, alerta ante cualquier amenaza. En algunas investigaciones se señala a tres neurotransmisores que están implicados en los estados de ansiedad, estos son: noradrenalina (NA), serotonina (5HT) y el ácido gamma aminobutírico (GABA) (Ildfonso, 2017. p. 56).

1.1.6. Ansiedad en relación con el insomnio, la depresión y el dolor crónico

Nuevas investigaciones han encontrado que los trastornos ansiosos y depresivos comparten aspectos ambientales y biológicos como: insomnio, depresión y dolor crónico. Biológicamente, se han identificado bases genéticas que regulan la señalización de citocinas neurotróficas e inflamatorias y neurotransmisores, esto hace que coexistan la ansiedad, el insomnio, la depresión y el dolor crónico en hasta un 60% de pacientes.

Existe una misma vía fisiopatológica común que ocasiona una sensibilización central al dolor con manifestaciones depresivas, ansiosas y alteraciones del sueño. La concomitancia de estos 4

padecimientos de forma natural hace que se puedan convertir en trastornos perpetuos, por eso la importancia del tratamiento en conjunto de los mismos a tiempo (Arango & Rincón, 2018).

1.1.7. Clasificación de la ansiedad

1.1.7.1. Trastorno de ansiedad por separación

Ansiedad generada por el miedo intenso y persistente ante la separación con una persona a la que nos une un vínculo estrecho, se deben evidenciar un mínimo de 3 manifestaciones clínicas, como pueden ser: preocupación, malestar psicológico, rechazo a quedarse solo, presencia de pesadillas o síntomas físicos ante la separación.

1.1.7.2. Mutismo selectivo

Incapacidad de hablar de manera persistente en situaciones que se debería hablar, a pesar de hablar sin problemas en diferentes situaciones.

1.1.7.3. Fobia específica

Ansiedad intensa y persistente, que aparecen de forma inmediata de manera invariable ante una situación u objeto, que se soporta de manera intensa o se evita.

1.1.7.4. Trastorno ansioso social

Ansiedad intensa que aparece siempre o casi siempre ante una situación social, las personas sienten miedo de actuar y quedar mal ante los observadores.

1.1.7.5. Trastorno de angustia

Es la aparición de crisis de angustia que habitualmente están acompañados de miedos a futuros ataques, o existe algún cambio de conducta para evitar el problema.

Ansiedad intensa que aparece siempre o casi siempre ante situaciones que expongan a la persona a espacios públicos abiertos, por ejemplo, el autobús, hacer filas, multitudes; etc. Además, estos actos deben ser evitados activamente por la persona y que generalmente pide un acompañante, cuando lo puede soportar, no puede estar tranquila y permanece con miedo intenso y ansiedad.

1.1.7.6. Agorafobia

Ansiedad intensa que aparece siempre o casi siempre ante situaciones que expongan a la persona a espacios públicos abiertos, por ejemplo, el autobús, hacer filas, multitudes; etc. Además, estos actos deben ser evitados activamente por la persona y que generalmente pide un acompañante, cuando lo puede soportar, no puede estar tranquila y permanece con miedo intenso y ansiedad.

1.1.7.7. Trastorno de ansiedad generalizada

Ansiedad intensa o preocupación excesiva con dificultades para controlar actividades o acontecimientos que se asocian a tres o más síntomas que afectan su funcionamiento habitual.

1.1.7.8. Trastorno de ansiedad producido por sustancias/medicación

Crisis de ansiedad o angustia producida poco después de ingerir o encontrarse en abstinencia de medicación o sustancias que puedan causar estas molestias.

1.1.7.9. Trastornos de ansiedad especificados

Ansiedad intensa que aparece siempre o casi siempre ante una situación específica, sin cumplir todos los criterios diagnósticos de los casos previos.

1.1.8. Síntomas generales de la ansiedad

Los síntomas que presenta la ansiedad son variables, debido a una preocupación constante ya sea por salud, familia, trabajo, estudios y situaciones económicas. Un gran porcentaje de pacientes presentan síntomas como palpitaciones, sudoración, temblores o sacudidas de los hombros, sequedad de la boca, e inquietud, presión o malestar torácico, sensación de malestar o ahogo, náuseas o dolor abdominal, respuestas de alarma exageradas y por último miedo extremo a morir (Odalís Isabel Fernández López, 2018).

1.1.9. Tratamiento de la ansiedad

El tratamiento va orientado al tipo de ansiedad que presente la persona y la causa, se maneja en 3 ejes fundamentales que son: psicoterapia, medicamentos ansiolíticos y de ser necesario terapias alternativas coadyuvantes.

1.1.9.1. Terapia cognitivo conductual (TCC).

Mediante la terapia el paciente aprende habilidades y técnicas para aliviar la ansiedad. El principal objetivo es identificar conductas y pensamientos negativos y no reales, e intercambiarlos por positivos.

El tratamiento psicoterapéutico, requiere la colaboración plena del paciente con su médico para el adecuado manejo de su patología, la psicoterapia constituye la concientización de los pensamientos irracionales generando una cognición negativa, transformando esta cognición en pensamientos positivos, para un excelente desenvolvimiento en la vida cotidiana.

1.1.9.2. Terapia de aceptación y compromiso.

El objetivo de esta terapia es dar técnicas al paciente para concienciar el problema y lidiar con pensamientos y sentimientos no deseados.

1.1.9.3. Biorretroalimentación.

Este tipo de terapia se basa en el control de la respuesta del cuerpo (respuesta psicológica) mediante técnicas de relajación y respiración. Este proceso se lleva a cabo junto a un terapeuta (Elsevier Interactive Patient Education, 2020).

1.1.10. Farmacoterapia usada para la ansiedad

Los fármacos para el tratamiento de la ansiedad son conocidos como ansiolíticos y antidepresivos, dentro de países desarrollados el consumo de este tipo de medicamentos ha tenido un aumento considerable, sin embargo, estas sustancias con un consumo crónico generan dependencia. Dentro de aquellos ansiolíticos de mayor consumo, se presentan las benzodiazepinas y los hipnóticos, siendo recomendable su uso en periodos muy cortos de tiempo (Toral, et al., 2019).

El tratamiento farmacológico se determina de acuerdo a la sintomatología y gravedad del paciente. Se seleccionan inhibidores de recaptura de serotonina (ISRS) siendo los de primera elección los siguientes:

- Duloxetina
- Escitalopram
- Imipramina

- Paroxetina
- Sertralina
- Venlafaxina (Academia Nacional de Medicina, 2013).

1.2. Benzodicepinas

Las benzodicepinas (BZD), conforman un grupo farmacológico de amplia prescripción a nivel mundial y nacional desde su aparición en la década de los 60 como sucesor de los barbitúricos. Estos fármacos poseen efectos farmacológicos ansiolíticos, anticonvulsivantes, hipnóticos y miorrelajantes. Cada BZD posee su rango de potencia, latencia, vida media y duración de acción (Dominguez, et al., 2016)

1.2.1. Clasificación de las benzodicepinas según la vida media

Las benzodicepinas se clasifican según su vida media en: benzodicepinas de acción larga, acción media y acción corta, así como se observa en la tabla 1-1.

Tabla 1-1: Clasificación de benzodicepinas según la vida media

Acción larga	Acción media	Acción corta
Diazepam	Lorazepam	Midazolam
Clonazepam	Temazepam	Triazolam
Nitrazepam	Ozazepam	
Clordiazepoxido		

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

1.2.2. Mecanismo de acción de benzodicepinas

Los conjuntos de fármacos pertenecientes a las benzodicepinas actúan a nivel del sistema límbico y en las regiones del tálamo e hipotálamo del sistema nervioso central y produce todo tipo de depresión incluyendo sedación, hipnosis y relajación del músculo esquelético, el efecto de las benzodicepinas se da a través de la fijación del ácido gamma aminobutírico, al receptor complejo (GABA)-benzodicepina.

La acción ansiolítica de las benzodicepinas pueden ser resultado de su capacidad para bloquear la excitación cortical y límbica después de la estimulación de las vías reticulares, mientras que las propiedades relajantes musculares están mediadas por la inhibición de las vías monosinápticas y polisinápticas (VADEMECUN, 2020)

1.3. Experimentación animal

El origen de la experimentación con animales para fines científicos, se establece por la similitud fisiológica con los humanos. Por tanto, el objetivo primordial es la de generar estudios que permitan corroborar fenómenos biológicos. Sin embargo, el dolor y sufrimiento animal han requerido la necesidad de establecer ciertos códigos y normas que potencialicen un mejor trato y manipulación de los animales experimentales (Romero, et al., 2017).

1.3.1. Normas éticas en el manejo de los animales

Para potencializar el respeto sobre la vida aparece el término Bioética, la conceptualización es amplia y abarca a todo ser vivo. El cuál, surge justamente por las necesidades humanas de descubrir nuevas teorías pero que con sus acciones han causado perjuicios morales dentro de una era basada en la tecnología y la ciencia.

Estos avances tecno-científicos se han visto delimitados por procesos donde involucran el uso de animales que no siempre ha sido controlado de manera ética. Por ello, en las últimas décadas se han desencadenado un sinnúmero de reglamentaciones para la vigilancia, control y evaluación de dicha problemática. Los animales han sido estudiados desde el ámbito experimental, lo que ha conllevado desde 1993 que la Bioética analice este problema, minimizando el uso de especies no humanas para la ciencia.

Existen varios principios éticos específicos que velan por el uso y el cuidado de animales, los cuales se describen a continuación

- Reducir el número de manipulaciones e intervenciones al animal dentro de su entorno para evitar la perturbación o reacciones de alerta.
- Establecer un entorno libre de agentes químicos, físicos y biológicos.
- Crear un lugar seguro que permita un adecuado confinamiento evitando fugas o el contacto con otros animales.
- Las zonas de confinamiento deben estar enfocadas solo a dicha actividad, además de cumplir con todos los requisitos según sea la experimentación.
- Se deben cumplir los objetivos propuestos en la investigación en un número mínimo de ensayos, pruebas, tiempo y animales (Molina, et al., 2015. p. 98).

1.3.2. Ratón

La biomedicina ha hecho que el uso de animales en experimentación haya ido aumentando de manera paralela a su desarrollo. Pudiendo definir como animal de laboratorio a todo ser vivo no humano, sea este invertebrado o vertebrado, que se usa para los fines científicos y de experimentación; se justifica su uso básicamente por la analogía fisiológica con la especie humana (Romero, et al., 2016).

Existe un conjunto de animales usados para este fin, en los cuales se encuentran los primates no humanos, prosimios, perros, gatos, ovejas, cerdos, cabras, roedores, reptiles, anfibios, peces e insectos. De estos, los roedores son los de mayor uso, y principalmente son utilizados los conejos, cobayos, ratas y ratones.

El ratón de laboratorio común que se utiliza puede pertenecer a la Clase Mamalia, Orden Rodetia, Familia Muridae, Género *Mus* y de Especie *musculus*, conocido habitualmente como *Mus musculus*, es un mamífero pequeño, originario de la India, utilizado desde hace varias décadas en estudios experimentales preclínicos puesto que son manejables, fáciles de criar en cautividad, con ciclos de vida rápidos y son confiables en comparación a los humanos para reproducir y analizar alteraciones como infecciones, problemas inmunes e inclusive el cáncer (Nilsson, et al., 2012).

Su genoma fue totalmente secuenciado en el 2005, solo después de la secuenciación del genoma humano, y más del 99% de los genes de ratón tienen su homólogo en el humano, lo que los vuelve candidatos idóneos para estudiar enfermedades habituales o complejas de los seres humanos e iniciar investigaciones preclínicas confiables de administración experimental de fármacos, en comparación con otras especies (Ocampo, et al., 2020).

A la fecha se utilizan en 3 tipos de áreas experimentales principalmente, la primera y más común es servir como modelo fisiológico o patológico en estudios *in vivo*, en segundo lugar, se utilizan para terapias transgénicas y construir nuevos ratones modelo con características específicas expresadas por alteración de sus genes, y en tercer lugar, se utilizan como cepa de fondo genético para crear generaciones subsecuentes con mutaciones espontáneas o inducidas (Mahajan, et al., 2016).

1.3.3. Ratón *Mus musculus*

El animal de experimentación utilizado en la presente investigación fue el ratón de la especie *Mus musculus*, mismo que se observa en la ilustración 1-1.



Ilustración 1-1: Ratón *Mus musculus*

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

1.3.3.1. Descripción: rasgos generales de la especie

Los ratones pertenecen a una familia de pequeños roedores, su tamaño es de aproximadamente 20 cm en total, la cola puede llegar a mediar de 6 a 10.5cm, su peso entre los 30 a 40 g, esta especie es la más usada en laboratorios para experimentación científica. El periodo de gestación es relativo entre 19 y 21 días. En condiciones óptimas la hebra puede producir 10 crías por camada, la época de lactancia dura tres semanas y a los dos meses las hembras ya se encuentran en condiciones de reproducirse. Tienen una visión deficiente, pero un oído agudo, sensibles a ruidos de alta frecuencia, sus otros sentidos como el gusto, tacto y olfato también son muy desarrollados además tienen la capacidad de trepar por las paredes con gran agilidad.

1.3.3.2. Clasificación científica de la especie

Nombre científico: *Mus musculus*

Otros nombres: Ratón albino

Reino: animalia

Filo: Chordata

Clase: Mammalia

Orden: Rodentia

Familia: Muridae

Género: Mus

Especie: *Mus musculus* (Rowe, 2018)

1.3.4. Aspectos bioéticos y legales

El estudio de animales en laboratorio ha desencadenado una rama de la ciencia que envuelve a la comunidad científica en la formación de directrices en todos los aspectos relacionados con la

experimentación animal. De manera fundamental el marco ético plantea que los animales no deben ser sometidos a sufrimiento físico o psicológico por lo que los experimentos se encuentran regulados por estrictas normas bioéticas. En cada país debe legislar el correcto cuidado y uso de los animales de laboratorio y asegurarse que se apliquen las cinco libertades y las 3R que consisten en:

- Reemplazar de forma total o parcial el uso de animales en el experimento
- Reducir la cantidad de animales por experimento
- Refinar las técnicas utilizadas en la cría, experimentación y eutanasia de los animales

Cada institución debe contar para este cumplimiento con un comité institucional que este encargado del cuidado y uso de animales de experimentación regido debidamente por una legislación (Romero, et al., 2016).

Para garantizar que las normas bioéticas se cumplan no solo se deben tomar en cuenta las normas de la legislación nacional, sino también las recomendaciones de organismos y asociaciones internacionales como: International Council of Laboratory Animal Science (ICLAS); Institute of Laboratory Animal Resources (ILAR); Universities Federation of Animal Welfare (UFAW); American Association for Laboratory Animal Science (AALAS); Interagency Research Animal Committee (IRAC); Animal Welfare Regulations (AWRs); en nuestra región encontramos a la Federación de Sociedades Sudamericanas de Ciencias en Animales de Laboratorio (FESSACAL) y Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) (Romero, et al., 2016).

1.3.5. Modelos experimentales, test comportamentales en animales

Los modelos experimentales son la parte fundamental en cualquier estudio preclínico, y se considera en la actualidad a los roedores como el modelo animal experimental más adecuado.

La palabra *modelo* generalmente es utilizada para indicar la construcción de una hipótesis que se pone a prueba experimentalmente, y los protocolos desarrollados en organismos no humanos son efectuados con el objetivo de replicar las características del comportamiento, patológicas o fisiológicas de los pacientes con distintas dolencias. El objetivo final será medir respuestas conductuales a las situaciones presentadas (Pérez, y González, 2015).

En el caso de los productos naturales o plantas medicinales las pruebas para detectar actividad de los extractos con propiedades ansiolíticas potenciales se pueden clasificar en: neofobia, pruebas de conflicto, miedo condicionado, ansiedad social y pánico. Se pueden encontrar más de 30

modelos experimentales preclínicos que estudian fármacos sobre la acción del sistema nervioso central, en los que se estudia la ansiedad, basados en la respuesta condicionada y no condicionada, es decir, con o sin entrenamiento previo respectivamente (Pérez, y González, 2015).

Por otra parte se debe considerar que independientemente del modelo que se utilice para un estudio, existen variables asociadas con la especie animal estudiada como son: raza, edad y género, además se debe considerar las condiciones del bioterio como son: niveles de iluminación, duración de la prueba, manipulaciones previas del animal estudiado, presencia o no del investigador, materiales utilizados y su tamaño, y las formas de medición de la prueba: automatizada o por visión experimentada (Pérez, & González, 2015. p. 45).

Los modelos actuales más conocidos y a ser utilizados en este estudio son cuarto claro oscuro, campo abierto y laberinto de cruz elevada de los cuales se dará una breve descripción a continuación. La mayoría de las evaluaciones se realizan mediante una observación constante de todo el experimento y se debe contabilizar, documentar y cuantificar la cantidad de eventos que se producen en cada uno de los experimentos, lo que puede generar errores.

1.3.5.1. Cuarto claro oscuro

Este test ideado por Crawley y Goodwin, se fundamenta en el hecho de que los roedores son animales que presentan mayor actividad durante la noche por tal motivo muestran un rechazo natural a la luz, además son curiosos exploradores lo que los impulsa a reconocer el lugar donde se encuentran, transitando en este caso de un lugar claro y oscuro por una abertura. Se evalúa en un tiempo corto y generalmente, el comportamiento del roedor es grabado en video para su posterior evaluación.

En este test se valoran parámetros como: las veces que el roedor pasó de un lugar a otro, tiempo de permanencia en cada zona clara/oscuro, los sitios que el animal ocupa en cada zona y el número de elevaciones de su cuerpo realizadas en cada compartimento (Moreno, et al., 2018).

1.3.5.2. Campo abierto

Esta prueba consiste en colocar un roedor en una caja de acrílico de modo solitario. En el piso de la caja se señalan de 9 a 12 cuadros que servirán para registrar la frecuencia de exploración en cada cuadro en sesiones que duran entre 2 a 5 minutos. El comportamiento estresante que se genera es de tipo ansioso debido a que el animal vive en comunidad, sin intentar distinguirse de

los demás; por lo que se generará ansiedad en primera instancia al separarlo de su grupo social y luego enfrentándolo al campo abierto que genera un tipo de agorafobia.

En cuánto se aplica la prueba con el fármaco a estudiar se analiza con el conteo de cuadros, si se evidencia una disminución en comparación con un grupo control, se considera que existe un comportamiento indicativo de una respuesta sedante (Pérez, & González, 2015).

1.3.5.3. Laberinto en cruz elevada

Este test es uno de los más utilizados en la evaluación de la ansiedad, permite la observación de la conducta exploratoria de los roedores en callejones abiertos y cerrados, intentando estimular al roedor con algo novedoso y de esa manera despertar ansiedad y curiosidad para continuar con la exploración. La experiencia actual arroja resultados en los que se evidencia que los roedores en ambientes abiertos muestran mayor miedo (Moreno, et al., 2018).

Se encontró que existen más de 5000 reportes según el buscador PubMed y más de 13500 en Science Direct sobre el uso del modelo laberinto de cruz elevada en la actividad experimental. Haciéndolo el modelo más utilizado, ya que permite la medición del miedo innato de esta especie por los espacios abiertos, aquí los fármacos se pueden administrar con facilidad en la ausencia del material estresante y luego de la exposición al mismo. Se mide mediante el espacio de tiempo que el roedor explora los brazos abiertos de la cruz y la frecuencia de entradas a éstos, demostrando el efecto ansiolítico (Pérez, & González, 2015).

Este modelo ha sido también autenticado en pruebas de diferentes especies como son: ratas, ratones, cerdos de guinea, ratones silvestres y hámster sirio (Moreno, et al., 2018).

1.3.6. Lavanda (Lavandula sp)

1.3.6.1. Descripción de la planta



Ilustración 2-1: Lavanda (*Lavandula sp*)

Realizado por: Alison Albuja, 2022.

En la figura 1-2, se observa la lavanda, misma que presenta las siguientes características: arbusto pequeño, aromático, puede alcanzar una altura de entre 1 y 1,5 metros. Las flores pueden tener una longitud de 15-20 cm desde las últimas hojas. Muy apreciado y característico por su flor y aroma. Es una planta mediterránea de origen portugués que sobrevive bajo condiciones relativamente sencillas. Se utiliza principalmente en la elaboración de perfumes (Kasper, et al., 2018)

1.3.6.2. Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: Lavandula

Especie: *Lavandula sp.* (Ramírez, & Goyes, 2018).

1.3.6.3. Hábitat y distribución

Son endémicas de la región mediterránea, particularmente de la Península Arábiga, las Islas Canarias y la India.

1.3.6.4. Composición química

La especie presenta compuestos como: linalol, acetato de linalol, alcanfor, cineole, fenchon y acetato de myrtenyl (Gonçalves, & Romano, 2012).

1.3.6.5. Usos comunes de la lavanda (Lavandula sp)

Como se mencionó, es una planta de tipo ornamental pero muy comercial para el desarrollo de perfumes. En la medicina se utilizan tallos con flores y hojas, por vía oral, para reducir trastornos nerviosos y digestivos, también como emenagogo; en compresas y baños para aliviar dolores reumáticos; por su acción balsámica se utiliza en inhalaciones y vahos en casos de catarrros, resfríos, laringitis y bronquitis (Kasper, et al., 2018).

Además, se utiliza por vía inhalatoria ya que se encuentra en el mercado en forma de aceites esenciales para aliviar el estrés, reducir la ansiedad y mejorar el estado anímico, mediante efectos en el sistema nervioso simpático, disminuyendo los niveles de cortisol, los cuales han sido comprobados mediante pruebas diagnósticas como las de cromogranina A, que es la principal

glicoproteína ácida aislada en la glándula suprarrenal, la cual disminuye significativamente luego de 10 minutos de aplicada la aromaterapia (Fajardo, 2018).

La estimulación olfatoria inducida por la aromaterapia provoca cambios fisiológicos que se hacen evidentes en la tensión muscular, tamaño de la pupila, temperatura de la piel, tensión arterial, aumenta el flujo de sangre por vasodilatación, mejora los estados del sueño y vigilia. Al inhalar ciertos tipos de olores se activa la liberación de serotonina, endorfinas y norepinefrina modulando neuroreceptores en el sistema inmune, sobresaltando el estado de ánimo, disminuyendo la ansiedad y suspendiendo la respuesta al estrés. Todos estos aceites esenciales pueden ser utilizados no solo por vía olfatoria, sino también por vía dérmica y oral con efectos similares (Fajardo, 2018).

Por estas razones, la lavanda (*Lavandula sp*) es considerada una planta medicinal por excelencia, muy reconocida desde la antigüedad y se recomienda ingerirla mediante infusión de sus flores secas, aunque también puede ser ingerida mediante el extracto puro y de alta concentración (Lara, 2018).

Los componentes por los que se logra estos efectos se han podido describir luego de obtener un extracto acuoso del arbusto mediante reacciones coloridas se obtuvieron: acetato de linalilo, cumarinas, flavonoides y xantanos (López, et al., 2013).

1.3.7. Naranja (*Citrus reticulata*)

1.3.7.1. Descripción de la planta



Ilustración 3-1: Naranja (*Citrus reticulata*)

Realizado por: Alison Albuja, 2022.

En la figura 1-3 se observa la planta de naranja, que comprende las siguientes características: todas las plantas de Naranja son compuestas por 2 partes. La parte superior denominada copa en

la que se encuentra el tronco con sus ramas, hojas y frutos y la parte radicular que se conforma generalmente por los primeros 15 centímetros del tronco y la raíz (González, y Tullo, 2019).

Las naranjas se cultivan en regiones tropicales y subtropicales del planeta evidenciando una alta capacidad de adaptación climática. Esto permite distribuirla en muchas zonas, pero la condición ambiental puede variar significativamente las características físicas y químicas de las plantas como: tamaño de la planta, aspecto de las hojas, longevidad de los frutos. En cuanto a la fruta como hay modificaciones en el tamaño, la forma, el color de la cáscara, textura, color de la pulpa, tenores de ácidos y azúcares. La temperatura y la humedad son los factores climáticos que ejercen principal influencia sobre los Cítricos (González, & Tullo, 2019).

1.3.7.2. Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta,

Clase: Magnoliopsida,

Subclase: Rosidae,

Orden: Sapindales,

Familia: Rutaceae,

Género: Citrus,

Especie: *Citrus reticulata* (Ramírez & Goyes, 2004, p. 68).

1.3.7.3. Hábitat y distribución

Su adaptación se establece entre los 800 a 2000 m.s.n.m, por lo cual se puede presentar de manera característica en los trópicos ecuatorianos además de algunos valles del Distrito Metropolitano de Quito (Stacey, 2014).

1.3.7.4. Composición química

Su composición química está representada de acuerdo a sus componentes nutritivos, dentro de los cuales se presentan las vitaminas como la C como el complejo B, además de las liposoles (A, D, E, K). Minerales como calcio (Ca), fósforo (P), Hierro (Fe) (Stacey, 2014).

1.3.7.5. Usos comunes de la naranja (*Citrus reticulata*)

Desde tiempos remotos los frutos cítricos han conformado uno de los pilares en la salud humana, debido a la contribución de nutrientes y sus componentes bioactivos. Esta fruta se origina en las regiones subtropicales y tropicales de Asia, desde donde se ha ido introduciendo a todas las regiones del mundo que tienen un clima cálido adecuado (Cebadera, 2017).

Dentro de los beneficios de este fruto con sus flores y hojas se han podido describir efectos sobre la depresión y la ansiedad, además de la reparación de la inmunosupresión, principalmente gracias al contenido de limoneno en el aceite esencial que supera el 97 % en todos los estados de madurez de la fruta, además contiene β -mirceno, α -pineno y α -felandreno que ejercen efecto sobre la ansiedad y prometen ser buenas alternativas en la farmacología en un futuro cercano (Durán, et al., 2012).

Por otra parte, el balance nutrimental señala que la naranja tiene N, 2.9%; P, 0.3%; K, 0.84%; Ca, 3.45%; Mg, 0.67%; Mn, 36 mg kg⁻¹; y Cu, 17 mg kg, cabe señalar que un adecuado aporte de estos oligoelementos contribuiría a una adecuada salud mental, con niveles de ansiedad bajos (Pérez, 2005).

En relación con la parte específica a emplear en el estudio, que es la hoja, ha sido utilizada para patologías que involucran la bilis y para el dolor estomacal, también presenta acción expectorante, antiparasitaria y antiespasmódica. En ocasiones se emplean combinaciones de hojas y flores, en infusiones, administradas por vía oral. De igual forma se utiliza como calmante, ayuda con el insomnio y la epilepsia (Escamilla, et al., 2015).

Por estas propiedades ansiolíticas y sedantes se han desarrollado algunos estudios científicos, desafortunadamente son pocos los trabajos interdisciplinarios y con valor científico importante, lo que hace que la mayor parte del conocimiento actual sea empírico y aprendido de una generación a otra (Pérez, & González, 2015).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

En esta investigación se evaluó la actividad ansiolítica del extracto de lavanda (*Lavándula sp.*) y naranja (*Citrus reticulata*) aplicando varias concentraciones en ratones (*Mus musculus*), requiriendo para esta acción equipos de medición principalmente exploratorios y un cuarto con disponibilidad de dos momentos de luz.

2.1. Lugar de la investigación

El estudio fue realizado en los laboratorios de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en las áreas de Productos Naturales, Análisis Instrumental, Tecnología farmacéutica, Toxicología y la experimentación con animales en el Bioterio de la Facultad de Ciencias.

2.2. Tipo y diseño de la investigación

2.2.1. Tipo de investigación

La investigación fue experimental – cuantitativa, la misma que se basó en una evaluación del nivel de ansiedad en ratones de la especie *Mus musculus* al administrarles diferentes concentraciones de una combinación de extracto hidroalcohólico de lavanda y hojas de naranja (150 ppm, 200 ppm y 250 ppm). Las variables con las que se trabajó fueron:

- Variable dependiente: Actividad ansiolítica en ratones de la especie *Mus musculus*
- Variable independiente: Combinación de extractos hidroalcohólicos de lavanda (*Lavandula sp.*) y naranja (*Citrus reticulata*), en diferentes concentraciones.

2.2.2. Diseño de la investigación

La presente investigación tuvo un diseño cuasiexperimental, ya que para verificar una actividad ansiolítica se utilizaron extractos hidroalcohólicos en diferentes concentraciones, además existieron variables externas que no estuvieron bajo control total. Las variables con las que se trabajó fueron:

- Tiempo
- Número de defecaciones
- Velocidad

- Distancia recorrida

En esta investigación se usaron 30 ratones de la especie *Mus musculus*, los cuales cumplieron con los criterios de inclusión.

2.3. Población de estudio

2.3.1. Población de la variable dependiente

En esta investigación se utilizaron ratones (*Mus musculus*), adquiridos en la plataforma de bioterio del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública “Dr. Leopoldo Izquieta Pérez” (INSPI), ubicado en la ciudad de Guayaquil-Ecuador. Los reactivos biológicos cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

- Género de la especie *Mus musculus*, de sexo masculino
- Edad 2 a 3 meses de edad
- Peso variable entre 25 y 30 g
- Modelos animales que presenten un cuidado adecuado en su alimentación.

2.3.2. Población de la variable independiente

En la figura 2-1 se muestra el lugar en donde se recolectó el material vegetal correspondiente a Lavanda (*Lavandula sp.*) y Naranja (*Citrus reticulata*). Fueron recolectadas en la ciudad de Riobamba, específicamente en el sector de Ricpamba en la calle de los árboles y Fernando Díaz, de acuerdo a las coordenadas geográficas emitidas por Google Earth los datos fueron:

- Altitud: 2754 m.s.n.m.
- Latitud: -1.669227
- Longitud: -78.675520



Ilustración 1-2: Lugar de recolección de lavanda (*Lavandula sp.*) y naranja (*Citrus reticulata*)

Fuente: Google earth.

2.4. Técnica de recolección de datos

Para evaluar la actividad ansiolítica de la combinación de lavanda (*Lavandula sp*) y naranja (*Citrus reticulata*), se obtuvieron datos por medio del software Anxiolytic Lab, que se basa en el procesamiento de imágenes, facilitando así la obtención de los resultados, además se realizaron ensayos organolépticos y fisicoquímicos para comprobar la calidad del material vegetal.

2.5. Equipos, materiales y reactivos

2.5.1. Material vegetal

- *Lavandula sp.*
- *Citrus reticulata*

2.5.2. Material biológico

- Ratonos (*Mus musculus*) de 2 a 3 meses, machos con peso entre 25-30 g

2.5.3. Lista de equipos, materiales y reactivos utilizados en el laboratorio

En la tabla 2-1 se observan los equipos, materiales y reactivos que fueron utilizados para realizar el control de calidad de la materia prima.

Tabla 1-2: Control de calidad de materia prima

Materiales	Equipos	Reactivos
Cápsulas	Balanza analítica	Ácido clorhídrico al 10% Agua destilada
Crisoles de porcelana	Mufla	
Pinzas para cápsulas	Molino	Nitrato de Ag 0.1M
Reverbero	Estufa	
Espátula		
Vasos de precipitación		
Vidrio reloj		
Embudo		
Desecador		
Malla		

Realizado por: Alison Albuja, 2021

En la tabla 1-2 se observan los materiales, equipos, reactivos usados para realizar el tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos.

Tabla 2-2: Tamizaje Fitoquímico

Materiales	Equipos	Reactivos
Pipetas de 1mL, 5mL y 10mL Tubos de ensayo Pinzas para tubos de ensayo Frascos Ámbar 500mL Gradilla Papel filtro Vasos de precipitación de 250ml Reverbero Malla Probeta de 100 ml	Sorbona	Agua destilada Alcohol amílico HCl al 1% HCl concentrado Ácido sulfúrico concentrado Anhídrido sulfúrico concentrado Cloroformo Cinta de magnesio metálico Carbonato de sodio Etanol Éter Etílico Reactivo de Sudan III Reactivo de Mayer Reactivo de Dragendorff Reactivo de Wagner Reactivo de Borntrager Reactivo de FeCl ₃ Reactivo de Catequinas Reactivo de Fehling A y B Reactivo de Baljet Hidróxido de sodio al 5%

Realizado por: Alison Albuja, 2022.

Para la realización del control de calidad del extracto hidroalcohólico se usaron varios materiales, equipos y reactivos, mismos que se observan en la tabla 2-3.

Tabla 3-2: Control de Calidad del Extracto Hidroalcohólico

Materiales	Equipos	Reactivos
Frasco ámbar Probeta 100mL Picnómetro 10mL Vasos de Precipitación 50ml, 250mL Cápsulas de porcelana Pinzas para cápsulas Pizeta Reverbero	pH-metro Refractómetro Estufa Rotavapor	Etanol 70% Agua destilada

Realizado por: Alison Albuja, 2022.

En la tabla 2-4 se observan los materiales, equipos y reactivos que fueron usados para obtener el extracto concentrado.

Tabla 4-2: Obtención del extracto concentrado

Materiales	Equipos	Reactivos
Frasco ámbar Balón esmerilado 1000ml Espátula Probeta 250ml Papel aluminio	Rotavapor	Agua destilada Alcohol etílico 70%

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la presente investigación uno de los parámetros a obtener fue el valor de la cuantificación de los flavonoides y fenoles para lo que se utilizaron varios materiales, equipos y reactivos que se observan en la tabla 2-5.

Tabla 5-2: Cuantificación de Flavonoides y Fenoles

Materiales	Equipos	Reactivos
Balones de aforo de 25mL y 100ml Pipeta de 1ml 5mL y 10 ml Micropipeta de 250 µL Puntas amarillas y azules Piseta Papel aluminio Vasos de precipitación Tubos de ensayo Cronómetro	Balanza analítica Espectrofotómetro	Agua destilada Nitrato de sodio al 5% Tricloruro de aluminio al 10% Hidróxido de sodio 1M Reactivo de Folin - Ciocalteu Carbonato de calcio

Realizado por: Alison Albuja, 2022.

En la tabla 2-6 se observan los materiales, equipos y reactivos que se utilizaron en la evaluación de la actividad ansiolítica.

Tabla 6-2: Evaluación de la Actividad Ansiolítica

Materiales	Equipos	Reactivos
Cajas de Plástico Bebedores Rejillas Frascos ámbar 50mL Cánula Jeringuillas de 1ml	Balanza analítica Cámara acoplada a una estructura metálica (D-link) Computadora	Propilenglicol Clonazepam Extractos liofilizados

Realizado por: Alison Albuja, 2022.

2.6. Técnicas y métodos

2.6.1. *Recolección de plantas e identificación botánica*

La recolección de las plantas fue al azar, ya que fueron cortadas en la parte proximal de las ramas, tomando muestras de algunas de ellas, para ser transportadas a los laboratorios de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo se almacenaron dentro de fundas de papel periódico y fundas plásticas ziploc.

Luego de la recolección se procedió a identificar el material vegetal con la colaboración del Ing. Jorge Caranqui Msc. Botánico del herbario de la ESPOCH, estableciendo lo siguiente ver tabla 2-7:

Tabla 7-2: Taxonomía de las especies vegetales

Taxonomía	Lavanda	Naranja
Especie	<i>Lavandula sp</i>	<i>Citrus reticulata</i>
Familia	<i>Lamiaceae</i>	<i>Rutaceae</i>
Género	<i>Lavandula</i>	<i>Citrus</i>

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

2.6.1.1. Obtención de la muestra seca de *Lavandula sp* y *Citrus reticulata*

Las hojas de naranja (*Citrus Reticulata*) y lavanda (*Lavandula sp*) posterior a su recolección fueron lavadas y seleccionadas, para luego ser secadas a una temperatura de 25°C en la estufa durante 24 a 48 horas, como se menciona en la ilustración 2-2.



Ilustración 2-2: Diagrama de obtención de la muestra seca

Fuente: (Inca, 2019).

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la figura 2-2 se observa el proceso de la obtención de la muestra seca, puesto que la misma será utilizada para la obtención de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso.

2.6.2. Análisis fisicoquímico

2.6.2.1. Determinación de humedad (Pérdida por desecación - Método gravimétrico)

Se colocó en la cápsula previamente tarada 2 a 3 g de droga vegetal molida a 105°C, posteriormente se dejó en la estufa durante 3 h, luego se trasladó al desecador y por último se pesó, se repitió el proceso hasta obtener un peso constante (Ver ilustración 2-3).

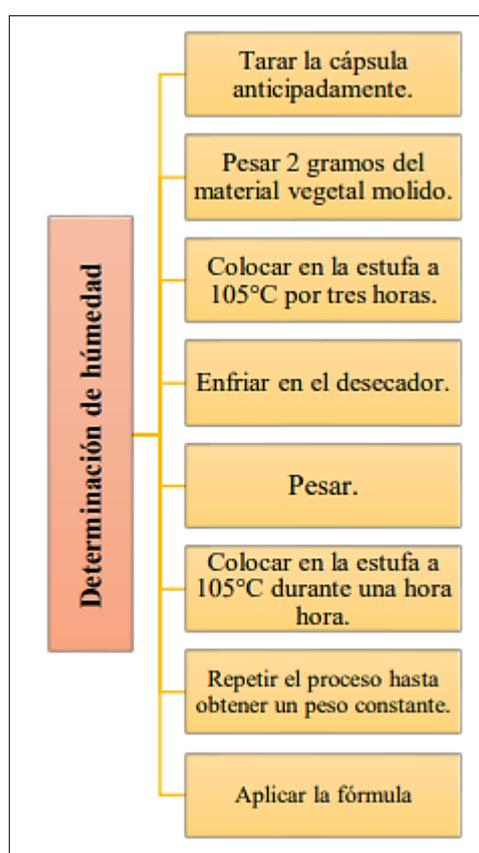


Ilustración 3-2: Diagrama de determinación de humedad

Fuente: (Inca, 2019).

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la figura 2-3 se observa el proceso para determinar el porcentaje de humedad del material vegetal, ya que debe encontrarse dentro de un rango, especificado por la USP 35 demostrando que esta muestra es útil en la investigación.

Para obtener los resultados, se empleó la siguiente fórmula:

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

%H= Porcentaje de humedad

m= masa de la cápsula vacía (g)

m₁= masa de la cápsula con la muestra desecada (g)

m₂= masa de la cápsula con la muestra (g)

100= factor matemático

2.6.2.2. Determinación de cenizas totales

Como primer paso se debe tarar los crisoles, luego se pesaron 3 g de material vegetal molido, el cual se trasladó a un reverbero para ser carbonizado, posteriormente, el crisol es llevado al horno mufla por 2 horas, con temperatura entre los 700-750°C, pasado ese tiempo el crisol es llevado al desecador por 30 minutos, y por último se pesa, se repite el procedimiento cada 30 minutos hasta alcanzar un peso constante (Ver figura 2-4).

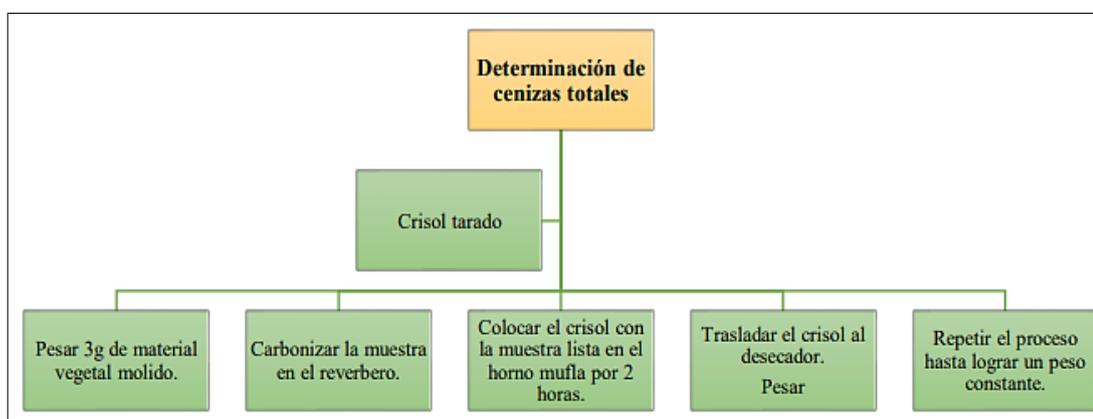


Ilustración 4-2: Diagrama de determinación de cenizas totales

Fuente: (Inca, 2019).

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

2.6.2.3. Determinación de cenizas solubles en agua

A las cenizas totales, se colocó 15 ml de agua destilada en donde se tapó con vidrio reloj y se calentó por 5 minutos. Luego se filtró la muestra, posteriormente el papel filtro con la muestra respectiva, se colocó en el crisol para ser carbonizado con ayuda de un reverbero; el siguiente paso fue colocar el crisol en la mufla a 700-750°C durante 2 horas para su incineración. Finalmente, el crisol fue colocado en el desecador y se pesó, este proceso se repitió hasta obtener un peso constante (Ver ilustración 4-2).

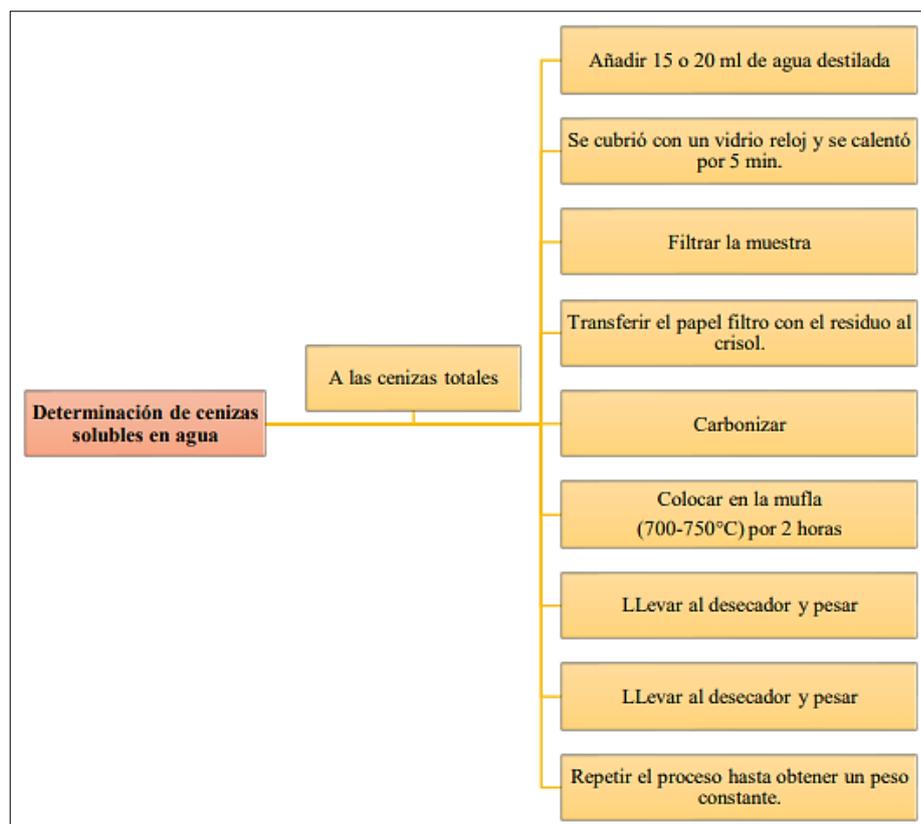


Ilustración 5-2: Diagrama de determinación de cenizas solubles en agua

Fuente: (Inca, 2019).

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

Para obtener los resultados, se empleó la siguiente fórmula:

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

%C= porcentaje de cenizas solubles en agua

m= masa del crisol vacío (g)

m₁= masa del crisol con la muestra incinerada (g)

m₂= masa del crisol con la muestra (g)

100 = factor matemático

2.6.2.4. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

Se añadió 2 ml de HCl 10% a las cenizas totales, se cubrió con vidrio reloj y se calentó durante 10 minutos en el reverbero. Con 5 ml de agua caliente se lavó el vidrio reloj para eliminar los residuos, el contenido se unió a la muestra del crisol. La muestra obtenida fue filtrada y lavada por 3 ocasiones con agua caliente, al filtrado se colocó dos gotas de nitrato de plata 0.1 mol. El filtrado y el residuo fueron colocados en el crisol para ser carbonizado luego se llevó a la mufla a

700-750°C durante 2 horas. Finalmente, el crisol fue colocado en el desecador para posteriormente ser pesado. (ver ilustración 5-2).

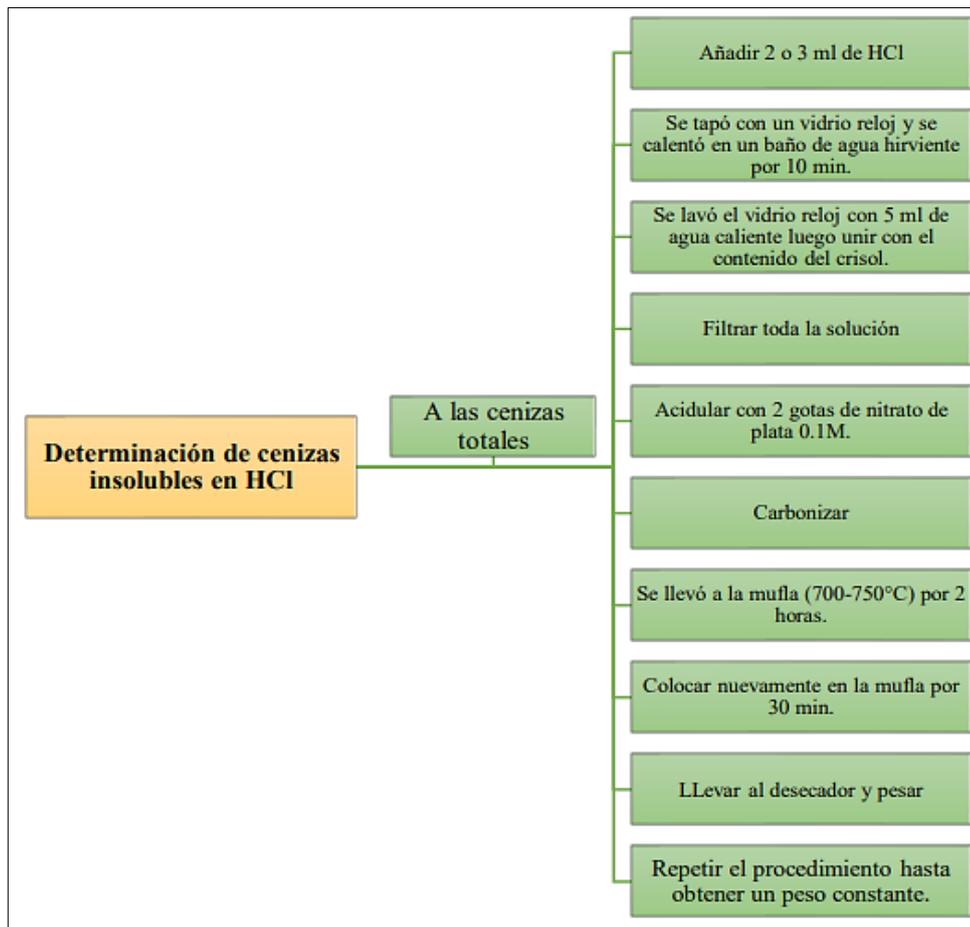


Ilustración 6-2: Diagrama de determinación de cenizas insolubles en agua

Fuente: (Inca, 2019).

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

Para obtener los resultados, se empleó la siguiente fórmula:

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

%B= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

m= muestra utilizada (g)

m1= masa del crisol con la muestra (g)

m2= masa del crisol con la ceniza insolubles en ácido clorhídrico (g)

2.6.3. Tamizaje o screening fitoquímico

El tamizaje o screening fitoquímico es una parte fundamental de esta investigación, ya que permite determinar cualitativamente los compuestos principales que se encuentran en el material vegetal. La extracción se realiza con solventes de polaridad creciente (éter de petróleo, etanol, agua) para asegurar una extracción correcta de los metabolitos.

2.6.3.1. Procedimiento para el tamizaje fitoquímico

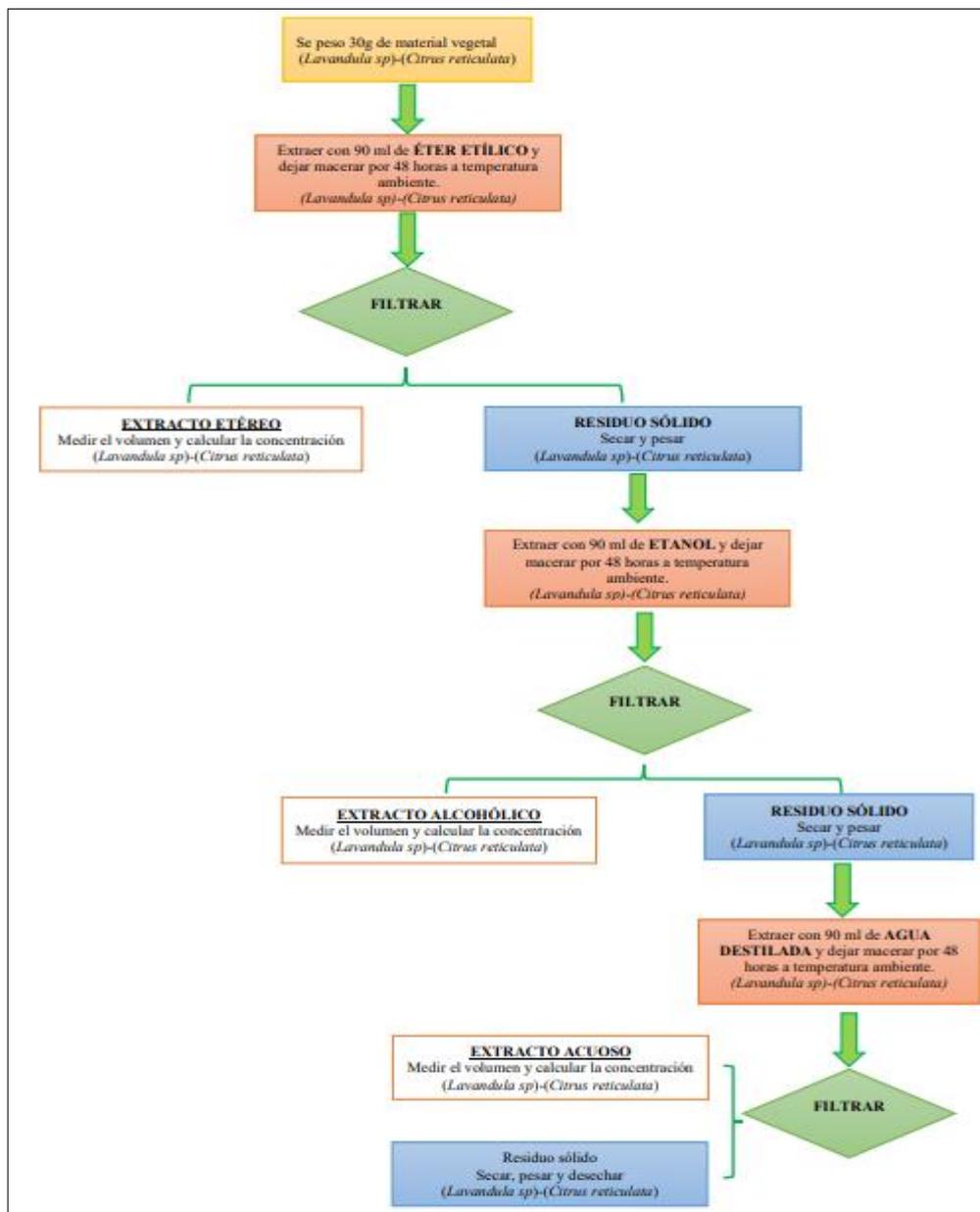


Ilustración 7-2: Diagrama de procedimientos para el tamizaje fitoquímico

Fuente: (Inca, 2019).

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

Los extractos fueron llevados a cabo según el procedimiento que se observa en la Figura 2-7, una vez obtenidos, se realizaron los ensayos correspondientes para identificar los metabolitos secundarios y su afinidad a cada uno de los solventes.

En la ilustración 8-2 se observa el diagrama de los ensayos realizados en el extracto etéreo

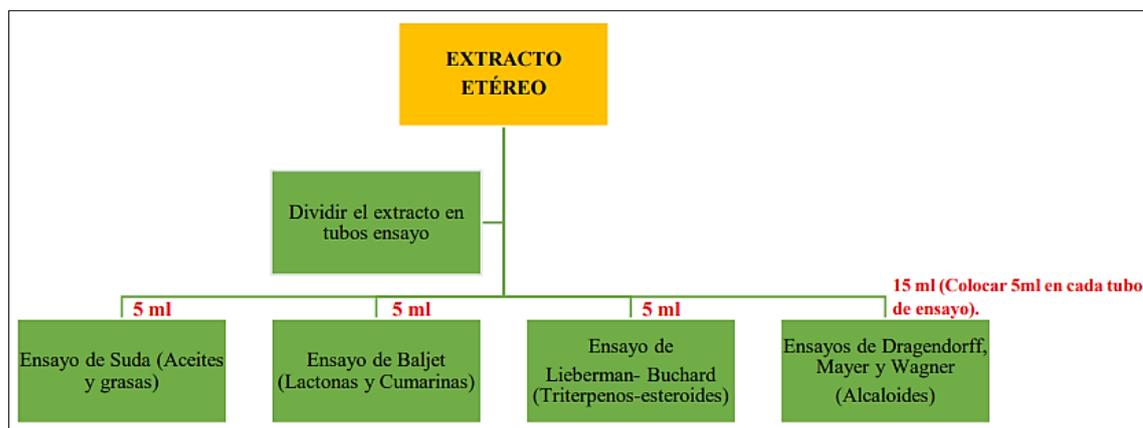


Ilustración 8-2: Diagrama de ensayos en extracto etéreo

Fuente: (Inca, 2019).

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la ilustración 8-2 se observa el diagrama de los ensayos realizados en el extracto alcohólico

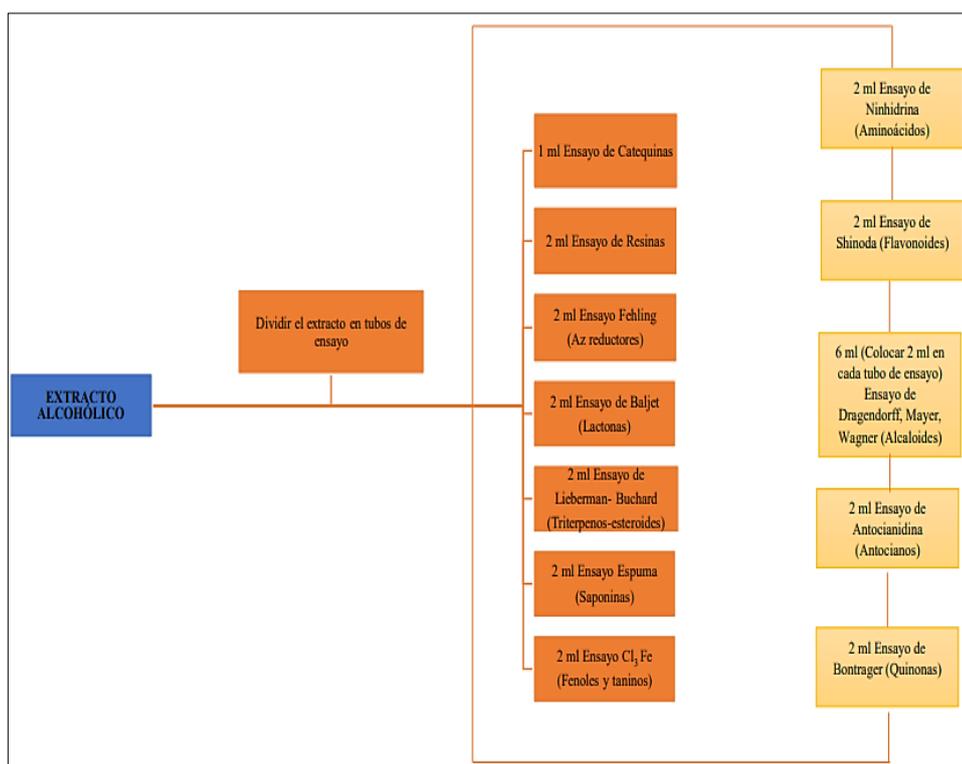


Ilustración 9-2: Diagrama de los ensayos realizados en el extracto alcohólico

Fuente: (Inca, 2019).

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la ilustración 10-2 se observan los ensayos realizados sobre el extracto acuoso

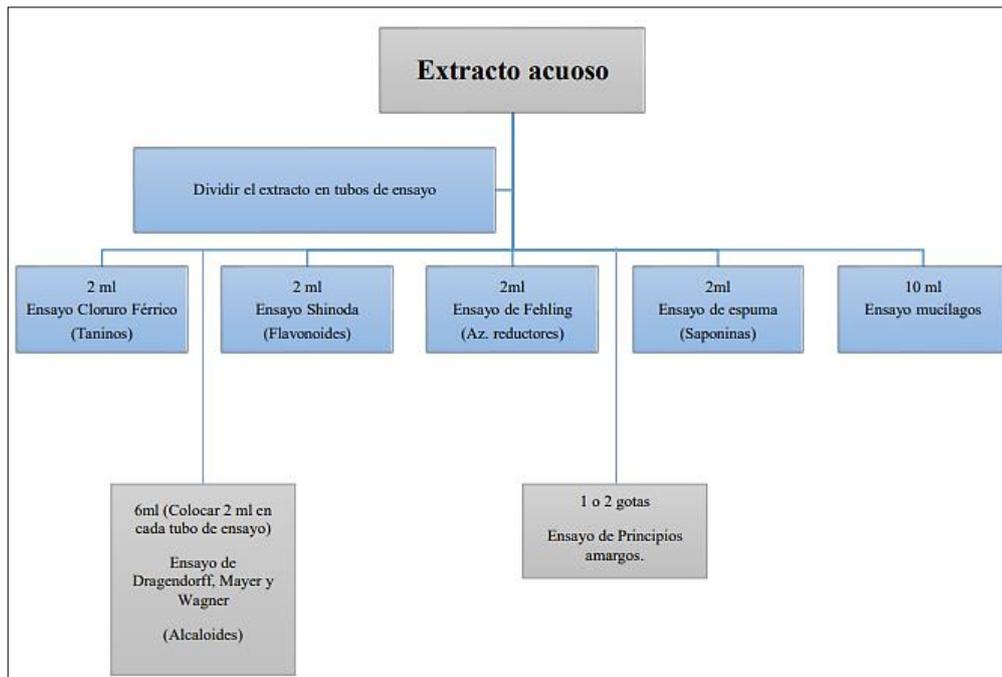


Ilustración 10-2: Diagrama de los ensayos del extracto acuoso

Fuente: (Inca, 2019).

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

2.6.4. Preparación de los extractos hidroalcohólicos de lavanda (*Lavandula sp*) y naranja (*Citrus reticulata*)

Para preparar los extractos hidroalcohólicos de lavanda (*Lavandula sp*) y naranja (*Citrus reticulata*) primeramente, se pesó 50 g del material vegetal seco y molido, luego se colocó en un frasco ámbar con 500 ml de etanol al 70%, posterior a ello se dejó macerar por 72 horas con agitación constante; pasado este tiempo el resultado de la maceración se procedió a filtrar, la solución obtenida se concentró en el rotavapor, teniendo como resultado un extracto sin alcohol, finalmente se congeló con nitrógeno y se liofilizó (Ver ilustración 11-2).

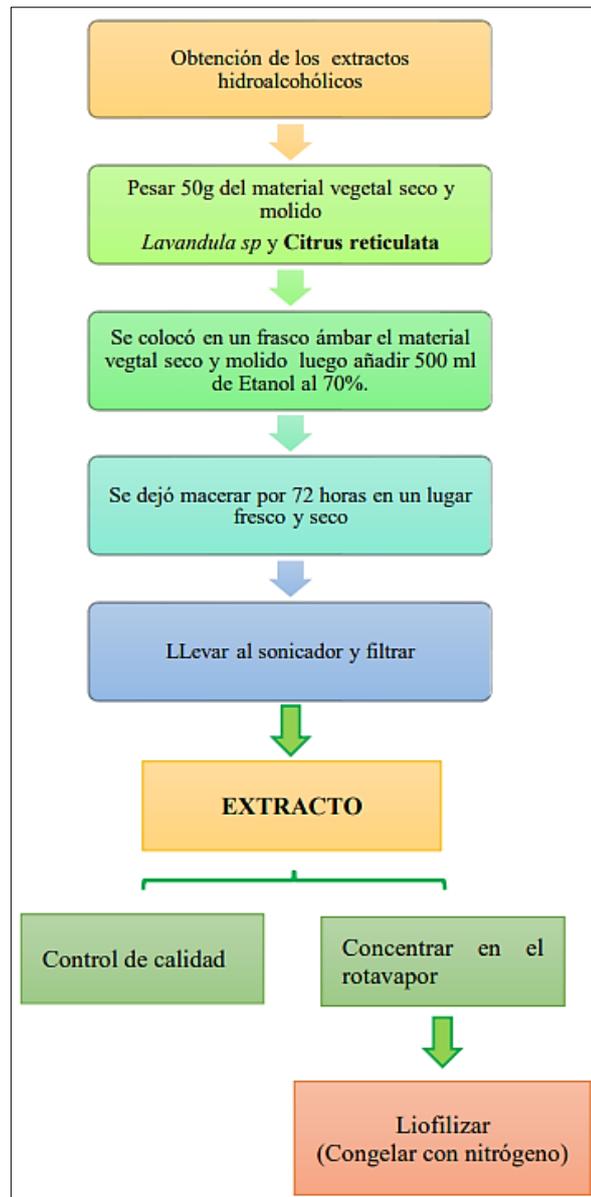


Ilustración 11-2: Diagrama de obtención de los extractos hidroalcohólicos

Fuente: (Inca, 2019).

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

2.6.5. Control de calidad de los extractos hidroalcohólicos

2.6.5.1. Requisitos organolépticos

Las pruebas organolépticas se realizaron mediante la visión, el olfato y el gusto; con esta prueba se determinó el color, olor, sabor y aspecto del extracto.

2.6.5.2. Determinación de densidad relativa

La densidad relativa se realiza con un picnómetro, primero se pesa el picnómetro seco y vacío, luego se debe pesar el picnómetro lleno con agua destilada a 25°C, por último, se pesa el picnómetro lleno con el extracto a 25°C.

Para obtener los resultados, se empleó la siguiente fórmula:

$$D = \frac{m_1 - m}{m_2 - m}$$

m= Peso del picnómetro vacío.

m₁= Peso del picnómetro con muestra del extracto.

m₂= Peso del picnómetro con agua.

2.6.5.3. Determinación del índice de refracción

Esta prueba se realiza con un refractómetro automático digital, se coloca una gota del extracto sobre el prisma y por medio del espejo del instrumento se enfoca la luz que ingresa sobre la entrada del prisma, obteniendo un valor de refracción.

2.6.5.4. Determinación de pH

Para la determinación del pH se utiliza un pH-metro digital, se coloca una cantidad de muestra en un vaso de precipitación y se mide el pH con un electrodo.

2.6.5.5. Determinación de sólidos totales

Se añade 5ml de extracto hidroalcohólico en una cápsula previamente tarada para ser evaporada en baño maría, luego se colocó la cápsula dentro de la estufa a 105°C durante 3 horas. Transcurrido este tiempo se llevó la cápsula al desecador y finalmente se pesó, se repite el proceso hasta obtener un peso constante.

Para obtener los resultados se empleó la siguiente fórmula:

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

ST= sólidos totales de la muestra

P= masa de la cápsula vacía (tarada)

Pr= masa de la cápsula con el residuo

V= volumen de la alícuota del ensayo

2.6.6. Cuantificación de Flavonoides totales (Método de AlCl₃)

En la determinación de flavonoides totales, se tomó 1ml de solución de quercetina y 1ml de la solución problema, se añadió a los tubos de ensayo; se adicionó 4ml de agua destilada y 0,3ml de nitrato de sodio al 5%. Luego los tubos de ensayo se llevaron a la oscuridad durante 5 minutos. Al completarse este tiempo se aumentó 0,3ml de cloruro de aluminio (AlCl₃) al 10%, se vortericizó durante 1 minuto y se dejó reposar 5 minutos.

Finalmente, se añadió 2ml de hidróxido de sodio 1M y se agitó por 15 segundos, pasado este tiempo se evidenció un complejo rosado gracias a la unión de los flavonoides con el aluminio, y se dejaron los tubos en completa oscuridad por 15 minutos para terminar, se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 510nm.

2.6.7. Cuantificación de fenoles totales

Se tomó 250 ul de la solución problema y 1ml de solución estándar de ácido gálico en un balón de aforo de 25ml, posteriormente se añadió 15ml de agua destilada y 0,5ml de reactivo de Folin-Ciocalteu, se esperó 5 minutos y se colocó 0,5ml de la solución de carbonato de calcio al 20% con 5ml de agua destilada, se dejó reposar durante 2 horas en la oscuridad a temperatura ambiente, al finalizar el proceso se ejecutaron las lecturas en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 765nm.

2.6.8. Actividad ansiolítica

Los animales de experimentación pasaron por un periodo de adaptación en el bioterio de la carrera de Bioquímica y Farmacia, se los mantuvo a una temperatura entre 21 - 23°C, y con un ambiente de 12 horas con luz y 12 horas sin luz, evitando el ruido. Los grupos para esta investigación fueron creados al azar, se los colocó en cajas plásticas con rejillas, con tamo esterilizado, comida y agua clorada.

Los extractos liofilizados de lavanda (*Lavandula sp*) y naranja (*Citrus reticulata*) fueron reconstituidos con propilenglicol al 15% (Vehículo), las concentraciones para la dosificación se pueden observar en la tabla 2-4, a cada especie se le administró 0,5ml de los tratamientos por vía oral, y se esperó 30 minutos para iniciar con las pruebas de cada equipo.

En la tabla 2-8 se observan los tratamientos, dosis, concentraciones, número de ratones y códigos que se utilizaron durante la investigación.

Tabla 8-2: Tratamientos, dosis, concentración y códigos de los grupos de investigación

Tratamiento	Concentración	Dosis	Número de ratones	Código
Blanco	-	-	6	0
Clonazepam (Control)	2.5mg/ml	0.5ml	6	0+
Combinación de los extractos de Lavanda (<i>Lavandula sp</i>) y Naranja (<i>Citrus reticulata</i>)	150 ppm	0.5ml	6	A
	200 ppm	0.5ml	6	B
	250 ppm	0.5ml	6	C

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La evaluación de la actividad ansiolítica fue llevada a cabo mediante Test Comportamentales como son: campo abierto, cuarto claro – oscuro y laberinto en cruz elevado, los cuales corresponden a las pruebas no condicionadas, y con el apoyo del software “ANXIOLITIC LAB” se obtuvieron los resultados estadísticos.

2.6.8.1. Equipo Electrónico de medición Laberinto en Cruz Elevado

En la figura 2-12 se observa el equipo que se utilizó para esta prueba y tiene las siguientes características: una estructura de acrílico negro en forma de cruz, con dos brazos abiertos y dos brazos cerrados, sus especificaciones son: altura de 38 cm del suelo, la medida de sus brazos abiertos es de 30 cm de largo por 10 cm de ancho y las paredes de los brazos cerrados miden 20 cm de alto (Moreno, et al., 2018).

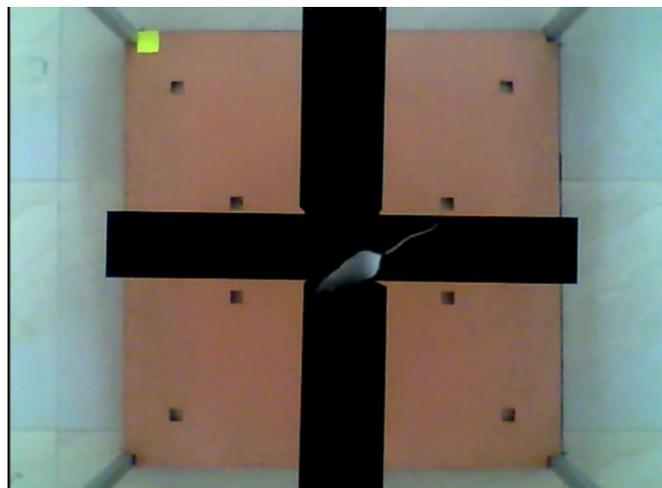


Ilustración 12-2: Equipo electrónico laberinto en cruz elevado

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

Es primordial revisar el equipo antes de iniciar con él estudio, además se debe verificar el funcionamiento de la cámara, una vez constatado esto se procede a colocar al animal en la mitad del laberinto en cruz elevada y se graba el video por 5 minutos, el mismo que se procesa en el software ANXIOLITIC LAB y de esta manera se obtiene la base de datos de este test comportamental (Ver ilustración 13-2).

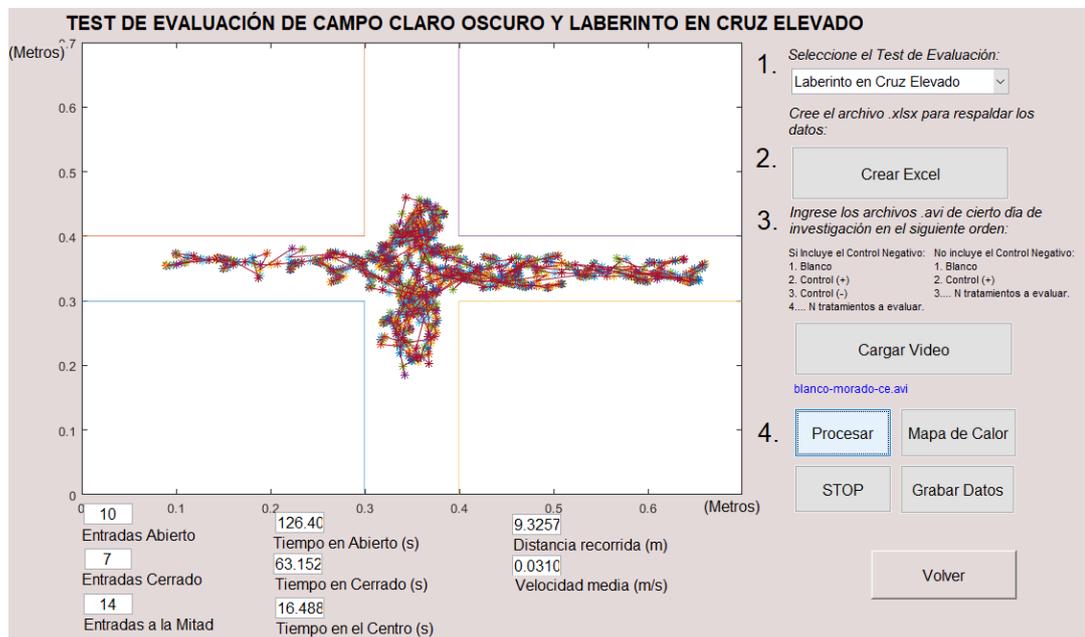


Ilustración 13-2: Teste de evaluación laberinto en cruz elevado

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

Mediante el software se consiguió gráficas de la trayectoria, las mismas que sirvieron para un mejor análisis de los resultados. La tabla 9-2 muestra los parámetros de evaluación de la actividad ansiolítica del equipo laberinto en cruz elevado.

Tabla 9-2: Parámetros de evaluación de la actividad ansiolítica en el equipo “laberinto en cruz elevado”

Distancia recorrida	Con una mayor actividad locomotora, existe un mayor desplazamiento.
Velocidad media	Mejor locomoción a mayor velocidad
Entradas en brazos cerrados	Ratón explorando
Entradas en brazos abiertos	Ratón explorando
Tiempo en el centro	El ratón intenta explorar el nuevo ambiente
Tiempo en brazos cerrados	Mayor tiempo, ratón con mayor nivel de ansiedad
Tiempo en brazos abiertos	Ratón menos ansioso

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

2.6.8.2. Equipo Electrónico de medición cuatro claro-oscuro

El equipo que se ocupa en esta prueba comportamental está fabricado de un material acrílico, en forma rectangular con las siguientes especificaciones: 44cm largo, 21cm ancho y 21cm profundidad. Presenta dos estaciones, una clara (transparente) de 29 cm de largo por 21 cm de ancho y otra estación oscura (negra) de 15 cm de largo por 21 cm de ancho, cabe mencionar que existe una pequeña ranura para el cruce de los ratones (Ver ilustración 14-2).



Ilustración 14-2: Equipo electrónico de medición campo claro – oscuro

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

Como en la prueba anterior se comprobó el funcionamiento correcto de la cámara, una vez que se verificó que todo funcionara bien, se colocó al roedor en el centro de la estación clara (transparente) y se inicia la grabación durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se procesó en el software ANXIOLITIC LAB, y se obtuvo la base de datos (Ver ilustración 15-2).

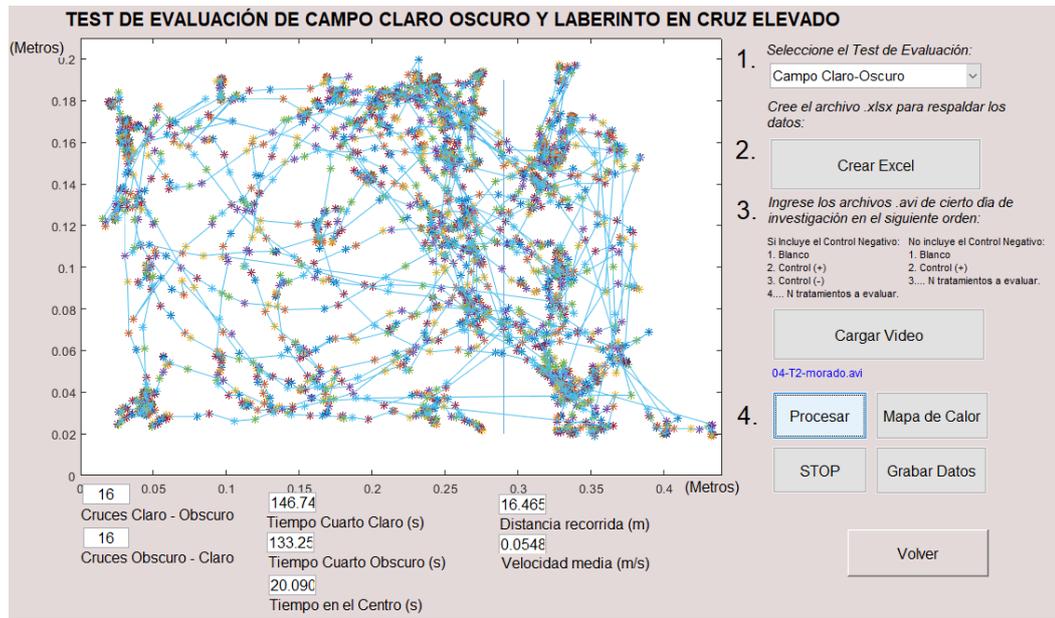


Ilustración 15-2: Test de evaluación campo claro – oscuro

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 2-10 presenta los parámetros de evaluación de la actividad ansiolítica en el cuarto claro – oscuro.

Tabla 10-2: Parámetros de evaluación de la actividad ansiolítica en cuarto claro - oscuro

Distancia recorrida	Mas movimiento aumenta su movilidad
Velocidad media	Tiempo recorrido en todo el espacio
Número de entradas cuarto claro	Mayor número de entradas mayor movilidad
Número de entradas cuarto oscuro	Mayor número de entradas mayor movilidad
Tiempo en cuarto claro	Ratón menos ansioso, busca segmento iluminado
Tiempo en cuarto oscuro	Ratón ansioso, busca el segmento oscuro

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

2.6.8.3. Equipo Electrónico de medición campo abierto

El equipo de campo abierto es un cuadrado transparente de material acrílico cuyas medidas son 68 cm de largo por 68 cm de ancho y sus paredes miden 45 cm de alto (Ver ilustración 16-2).

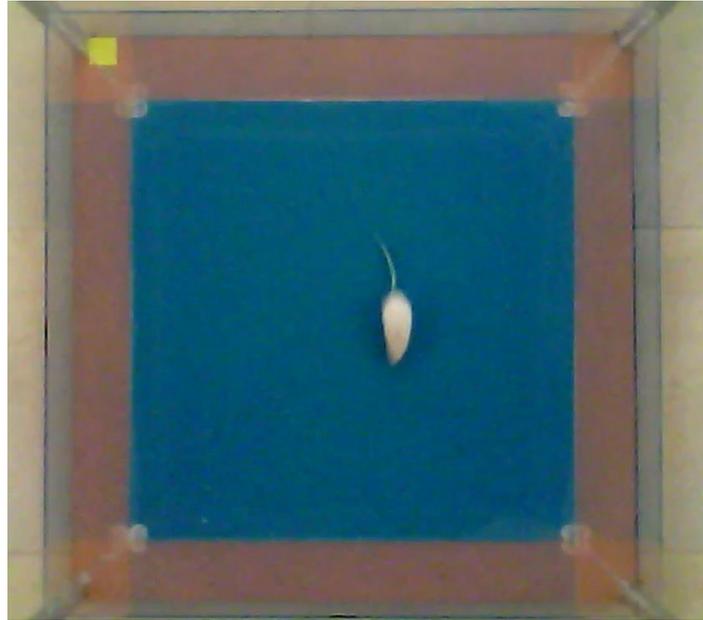


Ilustración 16-2: equipo electrónico de medición campo abierto

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

Se verificó que la cámara esté funcionando correctamente y se colocó al roedor en el centro del equipo y se empezó la grabación durante 15 minutos, finalmente el video se procesó en el software ANXIOLITC LAB, y se obtuvo la base de datos (Ver ilustración 17-2).

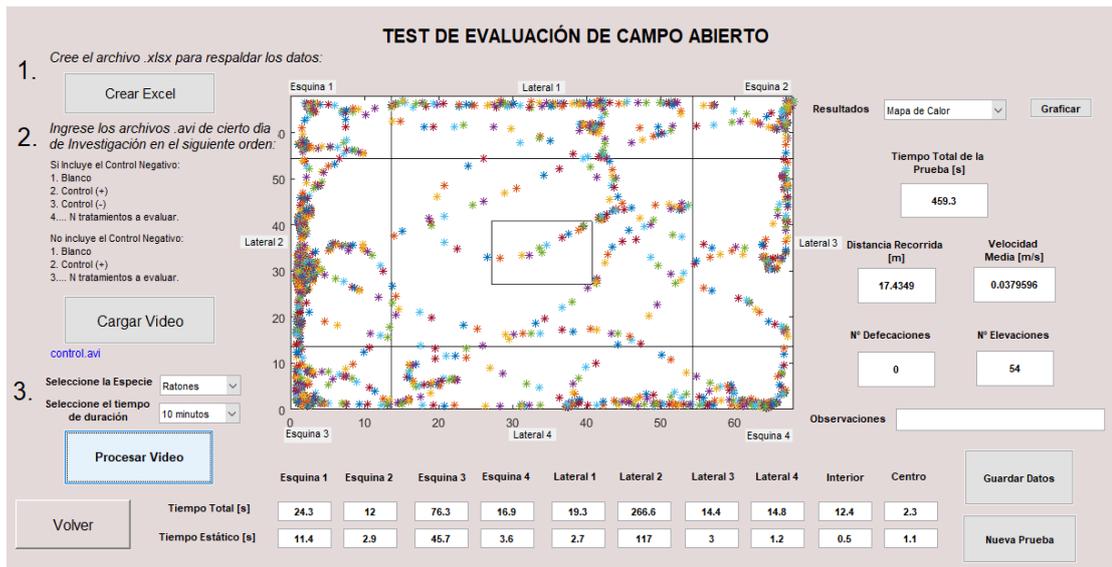


Ilustración 17-2: Test de evaluación de campo abierto

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 2-11 presenta los parámetros de evaluación de actividad ansiolítica en el test de campo abierto.

Tabla 11-2: Parámetros de evaluación de la actividad ansiolítica en campo abierto

Distancia recorrida	Una mayor distancia recorrida mejor movilidad
Velocidad media	Mayor velocidad mejor actividad corporal
Numero de elevaciones	Mayor número de elevaciones ratón relajado (menos ansioso)
Numero de defecaciones	Mayor número de defecaciones ratón estresado
Tiempo en las esquinas	Ratón ansioso busca lugares seguros
Tiempo en los laterales	Ratón ansioso busca lugares confiables
Tiempo en el centro	Ratón tranquilo explora el ambiente
Tiempo en el interior	Ratón tranquilo busca ambientes abiertos e iluminados

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

2.6.9. Procedimiento de uso de equipos

Para el manejo de los equipos y su correcto funcionamiento se utilizó el manual de usuario de ANXIOLITIC LAB, el primer paso consistió en armar el equipo, desinfectarlo y luego verificar el funcionamiento de la cámara que se encontraba conectada a una red WIFI y a una computadora. Posteriormente, se colocó al ratón en cada uno de los equipos y se iniciaron las grabaciones con el tiempo indicado para cada test (Ver figura 2-18).

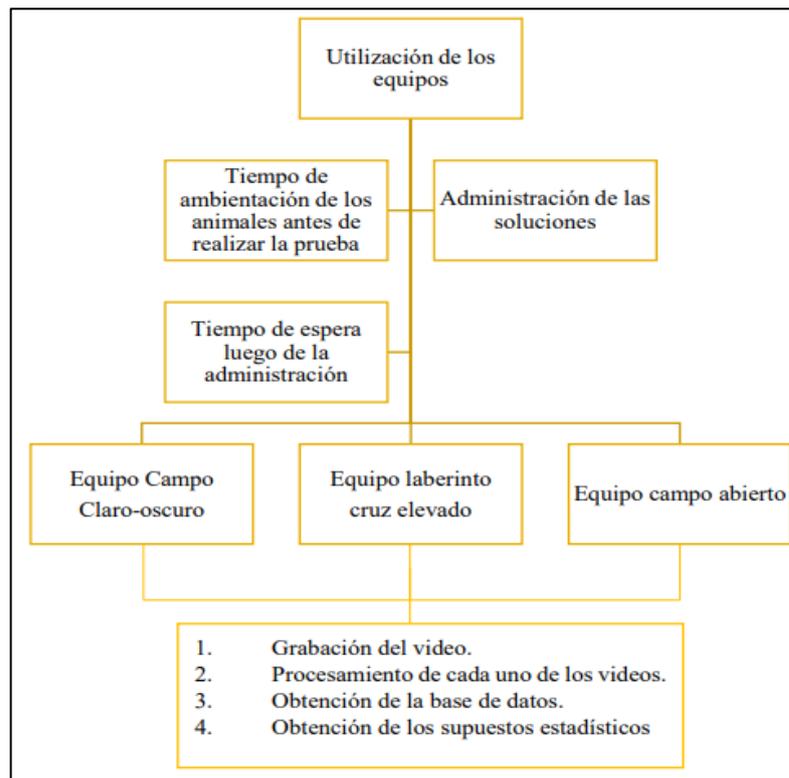


Ilustración 18-2: Procedimiento del uso de los equipos para los test comportamentales

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

2.6.10. Análisis estadístico

Las bases de datos obtenidas para cada prueba fueron procesadas en el software ANXIOLITIC LAB, se evidenció que los datos obtenidos presentaron una distribución normal a través del test de Lilliefors y homogeneidad de varianzas por medio del test Levene, para su posterior análisis de varianzas (ANOVA), y finalmente, se realizó comparaciones múltiples por el método de Tukey.

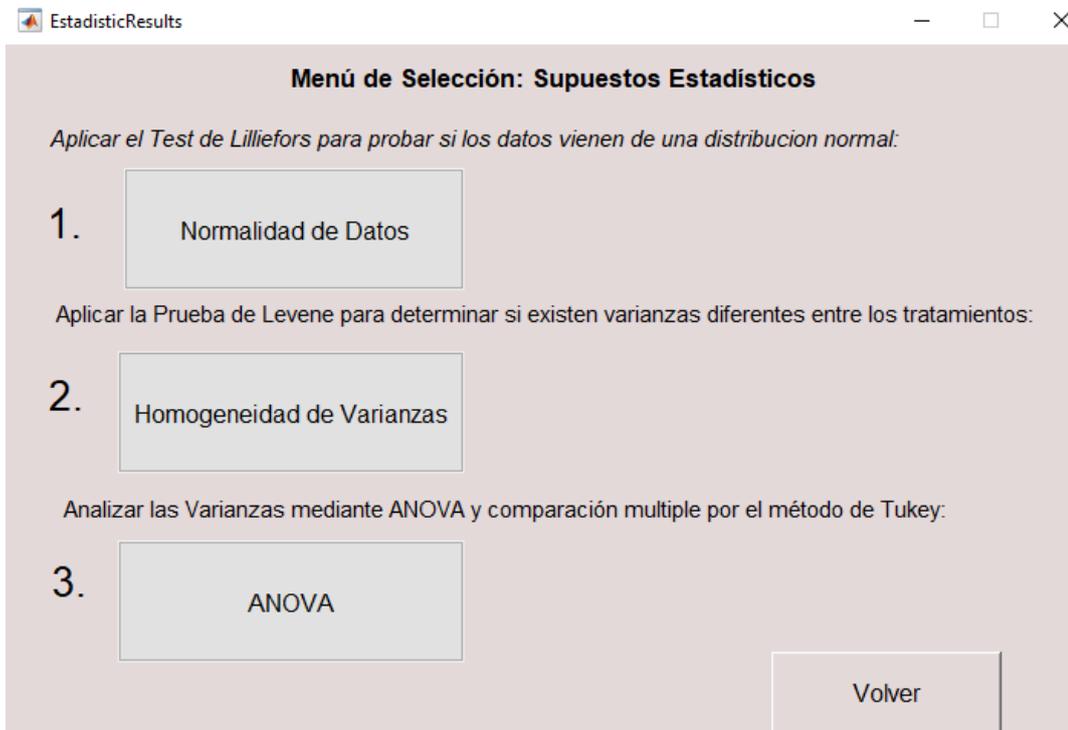


Ilustración 19-2: Supuestos estadísticos usados para la investigación.

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la figura 2-19 se observan los supuestos estadísticos usados durante la investigación: normalidad de datos, homogeneidad de varianza y ANOVA

A través de la tabla de normalidad obtenida por el Test de Lilliefors por medio del software ANXIOLITIC LAB, se determinó que el Estadístico D, tiene que ser menor al Valor Crítico para así, obtener datos estadísticos que mantengan una distribución normal.

Hipótesis nula (H₀): Los datos provienen de una distribución normal.

Hipótesis alternativa (H_a): Los datos no provienen de una distribución normal.

Cruces Claro-Oscuro				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0.5000	0.2213	0.3431
Control(+)	0	0.3675	0.2538	0.3431
T1	0	0.5000	0.2129	0.3431
T2	0	0.3291	0.2613	0.3431
T3	0	0.5000	0.2213	0.3431

Ilustración 20-2: Datos de la prueba de Homogeneidad de varianzas.

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

Mediante la prueba de homogeneidad de varianzas a través del Test de Levene, se corroboró que el Valor P debe ser mayor al nivel de significancia (0.05), de esta manera se demostró que existe una igualdad de varianzas (Ver figura 2-21).

Hipótesis nula (Ho): Existe igualdad de varianzas para todos los tratamientos.

Hipótesis alternativa (Ha): Existe al menos dos tratamientos que tienen varianzas diferentes.

Entradas en Brazos Abiertos	
Valor P	0.2823
dF 1	4
dF 2	20
Stat. Levene	1.3622

Ilustración 21-2: Parámetro de la prueba de homogeneidad de varianza, entradas en brazos abiertos.

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

A través de la prueba de ANOVA de un factor, se determinó que el Valor P debe ser menor al nivel de significancia (0.05), de esta manera se va a aceptar la hipótesis alternativa y establecer que existe por lo menos un par de tratamientos con diferencias estadísticas significativas (Ver figura 2-22).

Tabla ANOVA - Tiempo total en las Esquinas						
Source	SS	df	MS	F	Prob>F	
Columns	4.6266e+04	4	1.1566e+04	1.3296e+03	5.9738e-24	
Error	173.9905	20	8.6995			
Total	4.6440e+04	24				

Ilustración 22-2: Parámetro para la prueba de ANOVA, tiempo total en las esquinas.

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

Luego de haber determinado que existe diferencias estadísticamente significativas a través de las medias de los tratamientos mediante la tabla ANOVA de un factor, se verifico cuáles de los tratamientos presentaron medias diferentes por el método de Tukey.

Hipótesis nula (Ho): No existe diferencia significativa entre el par de tratamientos.

Hipótesis alternativa (Ha): Existe diferencia significativa entre un par de tratamientos.

En la tabla de comparaciones múltiples por la prueba Tukey a través del software AXIOLITIC LAB, se ejecutó la comparación con todos los tratamientos, en el cual aparecen dos columnas que van a corresponder al Grupo A y al Grupo B y van a constar los nombres de los tratamientos que tiene diferencias estadísticas significativas. Al final de la tabla se muestra el Valor P, cifra que debe ser menor que el nivel de significancia (0.05), y de este modo se va a aceptar la hipótesis alternativa (Ha) concluyendo que existe una diferencia significativa entre algún par de tratamientos (Ver figura 2-23).

Comparación Múltiple por Método de Tukey						
<i>Si : Valor P < Nivel de Significancia, existen diferencias significativas entre los respectivos dos tratamientos.</i>						
Grupo A	Grupo B	Intervalo de confianza Inf.	Estimación	Intervalo de confianza Sup.	Valor P	
Blanco	Control(...	92.4669	98.0489	103.6310	9.9661e-09	
Blanco	T1	2.0547	7.6367	13.2188	0.0046	
Blanco	T2	43.5613	49.1434	54.7254	9.9661e-09	
Blanco	T3	95.9665	101.5486	107.1306	9.9661e-09	
Control(...	T1	-95.9942	-90.4122	-84.8301	9.9661e-09	
Control(...	T2	-54.4876	-48.9055	-43.3235	9.9661e-09	
Control(...	T3	-2.0824	3.4997	9.0817	0.3611	
T1	T2	35.9246	41.5066	47.0887	9.9661e-09	
T1	T3	88.3298	93.9118	99.4939	9.9661e-09	
T2	T3	46.8231	52.4052	57.9872	9.9661e-09	

Ilustración 23-2: Parámetro de comparación múltiple por el método de Tukey

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS

3.1. Control de calidad de la droga vegetal cruda

3.1.1. Determinación de humedad

Tabla 1-3: Determinación de humedad

Especie vegetal	% HUMEDAD	Especificación (USP 35)
<i>Lavandula sp</i>	7,38 ±0.08	Hasta 14%
<i>Citrus reticulata</i>	6,73 ±0.05	

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la tabla 3-1 los resultados obtenidos muestran que la humedad obtenida de *Lavandula sp* está dentro del rango normal según la USP 35, ya que se obtuvo un valor de 7,38%. Los valores obtenidos para las hojas de *Citrus reticulata* también se encuentra dentro de los rangos normales según la USP 35 ya que el porcentaje de humedad fue de 6,73%. Estos resultados indican la calidad de la droga vegetal es óptima para la investigación, además que al encontrarse dentro de un porcentaje del rango especificado en la USP no afectaría la conservación y estabilidad de la droga vegetal.

El resultado de la *Lavandula sp* es comparable con el que se obtuvo en una investigación del mismo tipo en el 2019 acerca de la “Determinación de la actividad ansiolítica del extracto hidroalcohólico de las flores de lavanda en ratones” realizada por Erika Inca.

3.1.2. Determinación de cenizas

Tabla 2-3: Resultado de cenizas totales, cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico

Especie vegetal	Cenizas totales (%)	USP 35 %	Cenizas solubles en agua (%)	USP 35 %	Cenizas insolubles en HCl (%)	USP 35%
<i>Lavandula sp</i>	9,96 ± 0,04	Hasta 12 %	5,40 ± 0.02	Hasta 7%	1,78 ± 0.09	Hasta 5 %
<i>Citrus reticulata</i>	7,20 ± 0.06		4,35± 0.02		1,39 ± 0.04	

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la tabla 3.2 se observan los resultados de la lavanda (*Lavandula sp*) de cenizas totales con un valor de 9,96%, cenizas solubles en agua 5,40% y cenizas insolubles en HCl 1,78% de manera

que todos estos valores se encuentran dentro de los valores permitidos según la USP 35 y los resultados para la naranja (*Citrus reticulata*) fueron en cenizas totales 7,20%, cenizas solubles en agua 4,35% y para cenizas insolubles en HCl 1,39%, valores que están dentro de lo permitido según la USP 35. Puesto que los valores de las dos especies vegetales se encuentran en los rangos permitidos se da paso a los siguientes ensayos.

Los resultados de cenizas totales permitieron establecer la ausencia de materias extrañas en el material vegetal, un valor superior al permitido significaría errores en la recolección y almacenamiento de las plantas frescas. Un valor elevado de cenizas solubles en agua determina la cantidad de sales solubles en agua y la presencia de metales pesados en el material vegetal y los resultados de las cenizas insolubles en HCl permiten identificar presencia de sílice, arena y tierra en el material vegetal (Inca, 2019).

3.2. Tamizaje fitoquímico

Tabla 3-3: Resultados de ensayo fitoquímicos de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso

Extracto etéreo			
Ensayo	Metabolito identificado	Resultado <i>Lavandula sp</i>	Resultado <i>Citrus reticulata</i>
Sudan	Aceites y grasas	++	-
Dragendorff	Alcaloides	+++	+++
Mayer	Alcaloides	-	+
Wagner	Alcaloides	+++	+++
Baljet	Lactonas y cumarinas	++	-
Lieberman-Burchard	Triterpenos y/o esteroides	+++	+++
Extracto Alcohólico			
Ensayo	Metabolito identificado	Resultado <i>Lavandula sp</i>	Resultado <i>Citrus reticulata</i>
Catequinas	Catequinas	+	+
Resinas	Resinas	+++	-
Fehling	Az. Reductores	+	++
Baljet	Lactonas	-	-
Lieberman-Burchard	Triterpenos-esteroides	+++	++
Cl ₃ Fe	Fenoles y taninos	+++	+++
Espumas	Saponinas	+++	+
Ninhidrina	Aminoácidos	-	+
Bontrager	Quinonas	-	+
Shinoda	Flavonoides	+++	+++
Antocianidina	Antocianos	+++	++
Dragendorff	Alcaloides	+++	+++

Mayer	Alcaloides	-	+
Wagner	Alcaloides	+++	+++
Extracto acuoso			
Ensayo	Metabolito identificado	Resultado <i>Lavandula sp</i>	Resultado <i>Citrus reticulata</i>
Fehling	Az. Reductores	+	++
Cl ₃ Fe	Fenoles y taninos	+++	+++
Espuma	Saponinas	+	+
Shinoda	Flavonoides	+++	+++
Dragendorff	Alcaloides	+++	+++
Mayer	Alcaloides	+	+
Wagner	Alcaloides	+++	+++
Mucilagos	Mucilagos	+	+
Principios amargos	Principios amargos	++	+

Interpretación: No presencia (-), Baja presencia (+), Presencia (++) , Alta presencia (+++)

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la tabla 3-3 se observan los resultados obtenidos del análisis fitoquímico de lavanda (*Lavandula sp*) y naranja (*Citrus reticulata*), los solventes que se ocuparon para los diferentes ensayos fueron: éter de petróleo, etanol y agua, según su orden de polaridad.

Se logró identificar tanto en la lavanda como en la naranja metabolitos secundarios, los de mayor prevalencia fueron alcaloides, triterpenos - Esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides, y los de menor concentración son azúcares reductores, saponinas y mucílagos.

Los flavonoides y compuestos fenólicos presentan actividad biológica de gran importancia como cardioprotector, antimicrobiano, diurético, anticancerosos, y antioxidante, además sirven en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y está siendo estudiado su efecto ansiolítico, por lo que actualmente son de interés en diferentes investigaciones (Godoy, 2018).

Los extractos etéreo y alcohólico mostraron la presencia de triterpenos – esteroides, los cuales presentan propiedades beneficiosas para el ser humano, entre las cuales se destacan la actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antitumoral y antihipertensivas (Cely & Matulevich, 2014).

Los alcaloides fueron encontrados en los extractos de lavanda y de naranja, estos tienen propiedades antidepresivas, relajantes musculares, analgésicas que son importantes para la actividad ansiolítica que es el tema principal del presente trabajo de investigación (VILELA, et al., 2018).

3.3. Control de calidad del extracto hidroalcohólico

Tabla 4-3: Parámetros organolépticos

Extracto Hidroalcohólico	Parámetros			
	Olor	Color	Aspecto	Sabor
<i>Lavandula sp</i>	Alcohólico aromático	Verde olivo	Turbio	Amargo, ligeramente astringente
<i>Citrus reticulata</i>	Alcohólico aromático	Verde olivo	Turbio	Amargo astringente

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 3-3 mostró los resultados del control de calidad del extracto hidroalcohólico de lavanda (*Lavandula sp*) como de naranja (*Citrus reticulata*) de manera que se identificó un olor alcohólico aromático, un color verde olivo, y un aspecto turbio en los extractos de ambas plantas. El sabor de la lavanda fue amargo ligeramente astringente, por otro lado, el sabor de la naranja fue amargo astringente, debido principalmente a los metabolitos que presenta cada una de las plantas.

Tabla 5-3: Parámetros físicos – químicos

Extracto hidroalcohólico	Parámetros				
	pH	Índice de refracción	° Brix	Densidad relativa	Sólidos totales %
<i>Lavandula sp</i>	6.29	1.3663	20.32	0.90 g/ml	2,043
<i>Citrus reticulata</i>	6.46	1.3645	20.44	0.91 g/ml	1.901

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la tabla 3-4 se observan los parámetros fisicoquímicos analizados en el extracto hidroalcohólico, el pH de lavanda (*Lavandula sp*) es 6.29 y para la naranja (*Citrus reticulata*) de 6.46, los dos muestran una ligera acidez, debido a la presencia de los metabolitos secundarios como flavonoides, taninos, terpenos y fenoles.

Los valores del índice de refracción de *Lavandula sp* y *Citrus reticulata* fueron de 1.3663 y 1.3645, respectivamente. Resultados superiores al valor del índice de refracción del agua, por lo que se deduce que existen compuestos disueltos en los extractos.

La densidad relativa del extracto hidroalcohólico de lavanda (*Lavanda sp*) y naranja (*Citrus reticulata*) fue de 0.90 g/ml y 0,91g/ml respectivamente, este resultado muestra que existen sustancias disueltas en el extracto.

Los extractos hidroalcohólicos tienen una buena solubilidad y una considerable presencia de metabolitos ya que los porcentajes obtenidos en sólidos totales superaron el 1.20 %, en donde la lavanda (*Lavandula sp*) tuvo 2.043 % y la naranja (*Citrus reticulata*) 1.901 % (Godoy, 2018).

3.4. Cuantificación de flavonoides

Tabla 6-3: Cuantificación de flavonoides

Extracto hidroalcohólico	Flavonoides totales	
	mg equivalentes de quercetina/g de extracto seco	g equivalentes de quercetina/100g de extracto seco (% EQFT)
<i>Lavandula sp</i>	16.9 ± 0.012	1.69% ± 0.05
<i>Citrus reticulata</i>	15.3 ± 0.019	1.53% ± 0.08

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 3-5 presentó los resultados de la cuantificación de flavonoides contenidos en el extracto hidroalcohólico de lavanda (*Lavandula sp*) y naranja (*Citrus reticulata*), los cuales fueron 16.9 mg equivalentes de quercetina / 100 g de extracto seco y 15.3 mg de equivalentes de quercetina / 100 g de extracto seco respectivamente.

Los flavonoides como las flavonas, antocianinas y taninos, han demostrado presentar efectos ansiolíticos sin involucrarse en las funciones del sistema nervioso central (SNC), la cantidad de flavonoides presentes en el extracto puede variar según el lugar y el tiempo en el que se recolecte el material vegetal (Inca, 2019).

3.5. Cuantificación de compuestos fenólicos

Tabla 7-3: Cuantificación de compuestos fenólicos

Extracto hidroalcohólico	Fenoles totales	
	mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco	g equivalentes de ácido gálico/100g de extracto seco (% EQFT)
<i>Lavandula sp</i>	41.6 ± 0.04	4.16%
<i>Citrus reticulata</i>	39.7 ± 0.07	3.97%

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la tabla 3-6 se observan los resultados de fenoles totales del extracto hidroalcohólico de *Lavandula sp* y *Citrus reticulata* los cuales fueron 41.6 mg equivalentes de ácido gálico / g de extracto seco y 39.7 mg equivalentes de ácido gálico / g de extracto seco respectivamente.

La presente investigación muestra que la lavanda (*Lavandula sp*) y la naranja (*Citrus reticulata*) tienen un alto contenido de fenoles, estos metabolitos tienen un efecto antioxidante y una baja toxicidad, por lo que en la actualidad se busca realizar estudios para que estas plantas puedan sobresalir como potenciales fármacos (Katia Ramos, 2018).

3.6. Análisis de la actividad ansiolítica

3.6.1. Equipo electrónico de medición campo Claro - Oscuro

3.6.1.1. Prueba de normalidad

Tabla 8-3: Prueba de normalidad mediante la prueba de Lilliefors para el equipo de medición campo claro – oscuro.

Número de Cruces Claro Oscuro				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,5	0,221307142	0,3431
Control (+)	0	0,36746673	0,253810366	0,3431
T1	0	0,5	0,21286052	0,3431
T2	0	0,329059676	0,261258482	0,3431
T3	0	0,5	0,221307142	0,3431
Tiempo Cuarto Claro				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,5	0,186108151	0,3431
Control (+)	0	0,5	0,210661515	0,3431
T1	0	0,5	0,189566242	0,3431
T2	0	0,428516666	0,243212311	0,3431
T3	0	0,5	0,184585394	0,3431
Tiempo Cuarto Oscuro				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,317223719	0,263656514	0,3431
Control (+)	0	0,319413696	0,263209452	0,3431
T1	0	0,322615618	0,262558525	0,3431
T2	0	0,293765218	0,268535027	0,3431
T3	0	0,132756731	0,307729042	0,3431
Tiempo en el Centro				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,5	0,173377049	0,3431
Control (+)	0	0,181637369	0,293798325	0,3431
T1	0	0,5	0,219305206	0,3431
T2	0	0,5	0,20149871	0,3431
T3	0	0,5	0,206213805	0,3431

Distancia Recorrida				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,220680875	0,284587579	0,3431
Control (+)	0	0,5	0,213019957	0,3431
T1	0	0,32639003	0,261795426	0,3431
T2	0	0,363794974	0,254498691	0,3431
T3	0	0,5	0,207460755	0,3431
Velocidad Media				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,220680875	0,284587579	0,3431
Control (+)	0	0,5	0,213019957	0,3431
T1	0	0,32639003	0,261795426	0,3431
T2	0	0,363794974	0,254498691	0,3431
T3	0	0,5	0,207460755	0,3431

(H₀): Si H=0: Los datos provienen de una distribución normal.

(H_a): Si H=1: Los datos no provienen de una distribución normal.

La tabla 3-7 mostró los resultados de la prueba de normalidad mediante la prueba de Lilliefors, el nivel de significancia fue de 0.05 y los datos de las variables que se obtuvieron fueron: cruces claro oscuro, tiempo cuarto claro, tiempo cuarto oscuro, distancia recorrida y velocidad media. El análisis estadístico del software ANXIOLYTIC LAB, determinó que la base de datos de la prueba realizada en el equipo de medición campo claro – oscuro sigue una distribución normal.

3.6.1.2. Prueba de homogeneidad de varianzas

Tabla 9-3: Prueba de homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene para el equipo electrónico de medición campo claro – oscuro.

Cruces Claro Oscuro	
Valor P	0,969747913
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	0,12979351
Tiempo Cuarto Claro	
Valor P	0,550893198
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	0,78068702
Tiempo Cuarto Oscuro	
Valor P	0,052688578
dF1	4
dF2	20

Observaciones:	2,818438207
Tiempo en el Centro	
Valor P	0,837990579
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	0,354270253
Distancia Recorrida	
Valor P	0,456237231
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	0,949495981
Velocidad Media	
Valor P	0,456237231
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	0,949495981

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la tabla 3-8 se observan los resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas por medio del test de Levene, el nivel de significancia fue de 0.05 para las variables del equipo electrónico de medición campo claro – oscuro: cruces claro oscuro, tiempo cuarto claro, tiempo cuarto oscuro, distancia recorrida y velocidad media.

A partir de los datos obtenidos se evidenció que existe una homogeneidad de varianzas ya que el valor de P es mayor al nivel de significancia (0.05), afirmando que existe una igualdad de varianzas en los tratamientos.

3.6.1.3. Prueba de ANOVA de un factor

Tabla 10-3: Prueba de ANOVA de un factor para el equipo electrónico de medición campo claro-oscuro.

Tabla ANOVA - Cruces Claro Oscuro					
Source	SS	Df	MS	F	Prob>F
Columns	897,44	4	224,36	88,3307087	2,0378E-12
Error	50,8	20	2,54		
Total	948,24	24			
Tabla ANOVA - Tiempo en Cuarto Claro					
Source	SS	Df	MS	F	Prob>F
Columns	6453,36497	4	1613,34124	27,5745063	6,8714E-08
Error	1170,16873	20	58,5084363		
Total	7623,5337	24			
Tabla ANOVA - Tiempo en Cuarto Oscuro					

Source	SS	Df	MS	F	Prob>F
Columns	6158,59137	4	1539,64784	26,3870198	9,9003E-08
Error	1166,97365	20	58,3486825		
Total	7325,56502	24			
Tabla ANOVA - Tiempo en el Centro					
Source	SS	Df	MS	F	Prob>F
Columns	92,0913147	4	23,0228287	0,47533793	0,75335731
Error	968,693107	20	48,4346553		
Total	1060,78442	24			
Tabla ANOVA - Distancia Recorrida					
Source	SS	Df	MS	F	Prob>F
Columns	937,64163	4	234,410408	82,5123267	3,8658E-12
Error	56,818276	20	2,8409138		
Total	994,459906	24			
Tabla ANOVA - Velocidad Media					
Source	SS	Df	MS	F	Prob>F
Columns	0,01041824	4	0,00260456	82,5123267	3,8658E-12
Error	0,00063131	20	3,1566E-05		
Total	0,01104955	24			

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 3-9 evidenció los resultados obtenidos de la prueba de ANOVA de un factor de la medición de campo claro – oscuro, obtenidos a partir de ANXIOLITIC LAB, se determinó que los valores de Prob>F son menores que el nivel de significancia 0,05, por ende, estadísticamente habrá al menos dos tratamientos que tienen medias diferentes en cada parámetro.

El parámetro “Tiempo en el centro” el valor Prob>F es mayor que el nivel de significancia lo que quiere decir estadísticamente existe una igualdad de medias para los tratamientos.

3.6.1.4. Comparaciones múltiples del método Tukey

- **Número de cruces claro – oscuro**

Tabla 11-3: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey para el equipo electrónico de medición campo claro – oscuro. Parámetro número de cruces claro – oscuro.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	12,18378	15,2	18,21622	9,99E-09
Blanco	T1	4,183781	7,2	10,21622	5,85E-06
Blanco	T2	9,983781	13	16,01622	1,03E-08
Blanco	T3	12,98378	16	19,01622	9,97E-09

Control (+)	T1	-11,0162	-8	-4,98378	1,22E-06
T1	T2	2,783781	5,8	8,816219	0,00011
T1	T3	5,783781	8,8	11,81622	2,83E-07

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la tabla 3-10 se observa los resultados de las comparaciones múltiples obtenidas por el método de Tukey para el equipo electrónico campo claro – oscuro, esto se obtuvo a partir del software ANXIOLYTIC LAB, en donde se muestran los pares de tratamientos que presentan diferencias estadísticamente significativas.

En este parámetro se va a analizar el número de cruces que hace el ratón del cuarto claro hacia el cuarto oscuro y viceversa, lo que indica su actividad locomotora, es decir, que cuando mayor sea el número de cruces entre los cuartos, existe más movilidad del ratón.

El blanco (grupo al que no se le administró ninguna solución) mostró diferencias significativas con el control (+) (clonazepam 0.5mg/kg), ya que este último influye en la movilidad y comportamiento del ratón, por otro lado, no se observó una diferencia significativa entre los tratamientos T1 (150ppm) y T2 (200ppm) esto se le puede atribuir al tiempo del ensayo.

Del cuadro 3-10 se puede observar que hay diferencia significativa en el comportamiento entre el blanco y el resto de los tratamientos, asimismo se presentaron diferencias entre el control positivo y el T1. Indicando posiblemente, que el control positivo, T2 y T3 presentan comportamientos similares.

- **Tiempo en el cuarto claro**

Tabla 12-3: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey para el equipo electrónico de medición campo claro – oscuro. Parámetro tiempo cuarto claro.

Comparaciones múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	-58,2761	-43,7999	-29,3237	1,62E-07
Blanco	T2	-41,2968	-26,8206	-12,3444	0,000175
Blanco	T3	-50,266	-35,7898	-21,3136	3,5E-06
Control (+)	T1	18,64182	33,11804	47,59427	1,07E-05
Control (+)	T2	2,503114	16,97934	31,45556	0,016698
T1	T2	-30,6149	-16,1387	-1,66249	0,024314
T1	T3	-39,5841	-25,1079	-10,6317	0,000385

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 3-11 muestra los pares de tratamientos que tienen diferencias estadísticas las mismas que fueron obtenidas por el método Tukey en el parámetro tiempo cuarto claro, conseguido a través

del software ANXIOLITIC LAB, estos resultados indican que mientras más tiempo permanezca el ratón en este cuarto más tranquilo y relajado se encuentra.

Además, no se mostraron diferencias estadísticas significativas para el grupo control (+) con el tratamiento T3, esto podría revelar que el tratamiento T3 presenta similar actividad ansiolítica que el clonazepam.

- **Tiempo en el cuarto oscuro**

Tabla 13-3: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey para el equipo electrónico de medición campo claro – oscuro. Parámetro tiempo cuarto oscuro.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	27,08946	41,5459	56,00235	3,57E-07
Blanco	T2	16,02681	30,48326	44,9397	3,31E-05
Blanco	T3	22,2366	36,69305	51,14949	2,37E-06
Control (+)	T1	-44,036	-29,5795	-15,1231	4,94E-05
T1	T2	4,060445	18,51689	32,97333	0,008188
T1	T3	10,27023	24,72668	39,18312	0,000452

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 3-12 presenta los resultados de la prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey del parámetro tiempo en el cuarto oscuro, en donde se muestran los pares de tratamientos que tiene diferencias estadísticas significativas. Lo que revela este parámetro es el estado ansioso del ratón, según el tiempo, mientras el nivel de ansiedad sea elevado el ratón permanecerá en los lugares oscuros.

El blanco mostró diferencias significativas con el control (+) y los tratamientos T2 (200ppm), tratamiento T3 (250ppm). El control positivo presentó diferencias significativas con el tratamiento T1 (150ppm), mientras que los tratamientos T2 y T3 mostraron diferencias significativas con el tratamiento T1, lo que podría indicar que los tratamientos T2 y T3 presentarían actividad ansiolítica similar al medicamento.

- **Tiempo en el centro**

Para este parámetro se tiene en cuenta la tabla 3-9, que mostró los resultados de ANOVA de un factor donde se concluyó que no existen diferencias significativas entre las medias obtenidas. El tiempo de permanencia del ratón en este sitio determina la disminución de

la ansiedad, mientras mayor tiempo se encuentre el ratón en este sitio explorando, su nivel de ansiedad será menor.

En este parámetro influyen variables como el estrés generado por el estudio y la condición natural del ratón a explorar nuevos ambientes.

- **Distancia recorrida**

Tabla 14-3: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey para el equipo electrónico de medición campo claro – oscuro. Parámetro distancia recorrida.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	12,93157	16,12146	19,31134	9,98E-09
Blanco	T1	3,010339	6,200224	9,390109	9,61E-05
Blanco	T2	6,196181	9,386065	12,57595	2,48E-07
Blanco	T3	12,83267	16,02255	19,21244	9,99E-09
Control (+)	T1	-13,1111	-9,92123	-6,73135	1,07E-07
Control (+)	T2	-9,92528	-6,73539	-3,54551	3,25E-05
T1	T3	6,632446	9,822331	13,01222	1,24E-07
T2	T3	3,446604	6,636489	9,826374	3,96E-05

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la tabla 3-13 se observan los pares de tratamientos con diferencias estadísticas significativas obtenidas a partir de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey en el parámetro de distancia recorrida, lo que se muestra con estos resultados es la actividad locomotora del ratón, así que, a mayor distancia recorrida, el ratón tendrá mejor locomoción.

El blanco mostró diferencias significativas con todos los tratamientos, indicando que el control positivo y los extractos influyen en la locomoción del sujeto de experimentación.

- **Velocidad media**

Tabla 15-3: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey para el equipo electrónico de medición campo claro – oscuro. Parámetro velocidad media.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	0,043105	0,053738	0,064371	9,98E-09
Blanco	T1	0,010034	0,020667	0,0313	9,61E-05
Blanco	T2	0,020654	0,031287	0,04192	2,48E-07

Blanco	T3	0,042776	0,053409	0,064041	9,99E-09
Control (+)	T1	-0,0437	-0,03307	-0,02244	1,07E-07
Control (+)	T2	-0,03308	-0,02245	-0,01182	3,25E-05
T1	T3	0,022108	0,032741	0,043374	1,24E-07
T2	T3	0,011489	0,022122	0,032755	3,96E-05

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 3-14 indica los pares de tratamientos que contienen diferencias estadísticas en el parámetro de velocidad media por el método de Tukey, aquí se revela la rapidez del movimiento del ratón en el equipo utilizado, es decir mientras más veloz sea el ratón mejor motricidad tendrá. El blanco presenta diferencias con el control (+), con los tratamientos T1 (150 ppm), T2 (200 ppm) y T3 (250 ppm) esto quiere decir que la motricidad del ratón se ve afectada por las diferentes concentraciones del extracto y por el medicamento.

3.6.2. Equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado

3.6.2.1. Prueba de normalidad

Tabla 16-3: Prueba de normalidad mediante la prueba de Lilliefors para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado.

Entradas Brazo Cerrado				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,5	0,223519767	0,3431
Control (+)	0	0,5	0,230510078	0,3431
T1	0	0,5	0,230510078	0,3431
T2	0	0,125315002	0,310045869	0,3431
T3	0	0,5	0,230510078	0,3431
Entradas Brazo Abierto				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,5	0,178635294	0,3431
Control (+)	0	0,469354246	0,237139507	0,3431
T1	0	0,469354246	0,237139507	0,3431
T2	0	0,5	0,141405425	0,3431
T3	0	0,5	0,230510078	0,3431
Entradas en la Mitad				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,469354246	0,237139507	0,3431
Control (+)	0	0,469354246	0,237139507	0,3431
T1	0	0,296346154	0,267990607	0,3431
T2	0	0,5	0,230510078	0,3431
T3	0	0,158978549	0,3	0,3431
Tiempo en Brazo Cerrado				

	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,291056354	0,269108366	0,3431
Control (+)	0	0,5	0,216321166	0,3431
T1	0	0,195303744	0,290396259	0,3431
T2	0	0,5	0,144491202	0,3431
T3	0	0,5	0,177362829	0,3431
Tiempo en Brazo Abierto				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,410199426	0,246214067	0,3431
Control (+)	0	0,5	0,197458785	0,3431
T1	0	0,248536045	0,278341526	0,3431
T2	0	0,5	0,207010782	0,3431
T3	0	0,446739056	0,240392566	0,3431
Tiempo en el Centro				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,284178291	0,270572807	0,3431
Control (+)	0	0,240078993	0,280223737	0,3431
T1	0	0,5	0,198895498	0,3431
T2	0	0,051313127	0,342203425	0,3431
T3	0	0,337387107	0,259598869	0,3431
Distancia Recorrida				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,462111212	0,238150602	0,3431
Control (+)	0	0,5	0,230807266	0,3431
T1	0	0,173782646	0,295878809	0,3431
T2	0	0,5	0,218529252	0,3431
T3	0	0,5	0,224328446	0,3431
Velocidad Media				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,462111212	0,238150602	0,3431
Control (+)	0	0,5	0,230807266	0,3431
T1	0	0,173782646	0,295878809	0,3431
T2	0	0,5	0,218529252	0,3431
T3	0	0,5	0,224328446	0,3431

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

(H₀) Si H=0 Los datos presentan una distribución normal.

(H_a) Si H=1 Los datos no presentan de una distribución normal

La tabla 3-15 presenta los datos obtenidos de la prueba de normalidad por el test de Lilliefors con un nivel de significancia de 0,05% para las variables del equipo electrónico de medición de laberinto en cruz elevado: entradas en brazos cerrados, entradas en brazos abiertos, entradas en la mitad, tiempo en brazos cerrados, tiempo en brazos abiertos, tiempo en el centro, distancia recorrida y velocidad media. Mediante el análisis estadístico generado por el software

ANXIOLIC LAB se concluyó que los resultados obtenidos para todas las variables siguen una distribución normal.

3.6.2.2. Prueba de homogeneidad de varianzas

Tabla 17-3: Prueba de homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene para el equipo electrónico de medición en cruz elevado.

Entradas Brazo Cerrado	
Valor P	0,267425152
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	3,450081833
Entradas Brazo Abierto	
Valor P	0,282283634
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	1,362240289
Entradas a la Mitad	
Valor P	0,230034972
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	1,535684988
Tiempo en Brazo Cerrado	
Valor P	0,408300632
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	3,052108045
Tiempo en Brazo Abierto	
Valor P	0,745528737
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	2,507033015
Tiempo en el Centro	
Valor P	0,686802314
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	0,570887449
Distancia Recorrida	
Valor P	0,2486361
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	1,469823739

Velocidad Media	
Valor P	0,2486361
df1	4
df2	20
Observaciones:	1,469823739

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 3-16 mostró los resultados de la prueba de homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene, con un nivel de significancia de 0.05, para las variables del equipo de medición de laberinto en cruz elevado.

Los resultados fueron obtenidos mediante el software ANXIOLIC LAB, en el cual se determinó que los valores de P para todas las variables son mayores al valor de nivel de significancia (0.05), concluyendo que para los tratamientos existe igualdad de varianza en todos los parámetros del equipo de medición, cumpliéndose así la homogeneidad de varianzas.

3.6.2.3. Prueba de ANOVA de un factor

Tabla 18-3: Prueba de ANOVA de un factor para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado.

Tabla ANOVA - Entradas Brazo Cerrado					
Source	SS	df	MS	F	Prob>F
Columns	989,84	4	247,46	111,468468	2,2476E-13
Error	44,4	20	2,22		
Total	1034,24	24			
Tabla ANOVA - Entradas Brazo Abierto					
Source	SS	df	MS	F	Prob>F
Columns	612,96	4	153,24	55,9270073	1,4103E-10
Error	54,8	20	2,74		
Total	667,76	24			
Tabla ANOVA - Entradas en la Mitad					
Source	SS	df	MS	F	Prob>F
Columns	521,36	4	130,34	43,738255	1,2879E-09
Error	59,6	20	2,98		
Total	580,96	24			
Tabla ANOVA - Tiempo Brazos Cerrados					
Source	SS	df	MS	F	Prob>F
Columns	14262,5319	4	3565,63298	1101,72865	3,8806E-23
Error	64,7279706	20	3,23639853		
Total	14327,2599	24			
Tabla ANOVA - Tiempo Brazos Abiertos					
Source	SS	df	MS	F	Prob>F
Columns	11598,0463	4	2899,51157	282,874503	2,7049E-17

Error	205,003387	20	10,2501694		
Total	11803,0497	24			
Tabla ANOVA - Tiempo en el Centro					
Source	SS	df	MS	F	Prob>F
Columns	1166,55962	4	291,639905	22,7482274	3,3193E-07
Error	256,406708	20	12,8203354		
Total	1422,96633	24			
Tabla ANOVA - Distancia Recorrida					
Source	SS	df	MS	F	Prob>F
Columns	529,705869	4	132,426467	99,2947559	6,7471E-13
Error	26,6734061	20	1,3336703		
Total	556,379275	24			
Tabla ANOVA - Velocidad Media					
Source	SS	df	MS	F	Prob>F
Columns	0,00588562	4	0,00147141	99,2947559	6,7471E-13
Error	0,00029637	20	1,4819E-05		
Total	0,00618199	24			

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 3-17 presenta los resultados de la prueba de ANOVA de un factor obtenidos a partir del software ANXIOLITIC LAB, para cada parámetro del equipo de medición de laberinto en cruz elevado, se determinó que los valores de Prob>F son menores al valor del nivel de significancia (0.05), por lo que se concluyó que por lo menos dos tratamientos presentan medias diferentes para cada parámetro.

3.6.2.4. Comparaciones múltiples a través del Método de Tukey

- Entradas en brazos cerrados**

Tabla 19-3: Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado. Parámetro entradas en brazos cerrados.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	11,38017	14,2	17,01983	9,99E-09
Blanco	T2	1,780173	4,6	7,419827	0,00077
Blanco	T3	11,78017	14,6	17,41983	9,98E-09
Control (+)	T1	-15,8198	-13	-10,1802	1,01E-08
Control (+)	T2	-12,4198	-9,6	-6,78017	3,16E-08
T1	T2	0,580173	3,4	6,219827	0,013467
T1	T3	10,58017	13,4	16,21983	1E-08
T2	T3	7,180173	10	12,81983	2,08E-08

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la tabla 3-18 se observan los resultados de la prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado del parámetro entradas en brazos cerrados, solo se presentan los pares de tratamientos que tienen diferencias estadísticas significativas.

Este parámetro evalúa la actividad locomotora del ratón, según el número de entradas que tenga en esta área, al tener un elevado número de entradas se determina que existe una buena locomoción del ratón.

El blanco muestra diferencias con el control (+) (clonazepam 0.5mg/kg), con los tratamientos T2 (200 ppm) y T3 (250 ppm), lo que significa que estos tratamientos interfieren en la actividad locomotora del ratón. No se demuestra una diferencia estadística significativa entre el tratamiento T1 (150ppm) y el blanco (grupo al que no se le administro ninguna solución).

El control (+) (clonazepam 0.5mg/kg) mostró diferencias estadísticas significativas con los tratamientos T1 y T2, pero no con el tratamiento T3 por lo que se determinó que la concentración de este último tratamiento no influye en la locomoción del animal de experimentación, mientras que los tratamientos T1 y T2 si interfieren en la motricidad del ratón al contar con diferencias estadísticas significativas en comparación con el blanco.

- **Entradas en brazos abiertos**

Tabla 20-3: Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado. Parámetro entradas en brazos abiertos.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	8,267282	11,4	14,53272	1,69E-08
Blanco	T2	4,867282	8	11,13272	2,16E-06
Blanco	T3	8,467282	11,6	14,73272	1,51E-08
Control (+)	T1	-13,3327	-10,2	-7,06728	5,56E-08
Control (+)	T2	-6,53272	-3,4	-0,26728	0,029357
T1	T2	3,667282	6,8	9,932718	2,23E-05
T1	T3	7,267282	10,4	13,53272	4,3E-08
T2	T3	0,467282	3,6	6,732718	0,019487

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la tabla 3-19 se observan los resultados de la prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado para el parámetro entrada en brazos abiertos. Este parámetro evalúa la motricidad del ratón según el número de entradas que tenga en esta área, un elevado número de entradas significa que el ratón tiene una buena motricidad.

Como se observa en la tabla 3-18 el blanco mostró diferencias estadísticas significativas con el control (+) (clonazepam 0.5mg/kg), y con los tratamientos T2 y T3, pero no mostró diferencias con el tratamiento T1, lo que demuestra nuevamente que este último no interfiere en la motricidad natural del ratón.

El control (+) no mostró diferencias significativas con el tratamiento T3, lo que indicaría una influencia o alteración de la motricidad.

- **Tiempo en brazos cerrados**

Tabla 21-3: Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado. Parámetro tiempo en brazos cerrados.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	57,9344	61,33908	64,74377	9,97E-09
Blanco	T1	11,23677	14,64146	18,04614	1,03E-08
Blanco	T2	34,21411	37,6188	41,02349	9,97E-09
Blanco	T3	54,29275	57,69744	61,10212	9,97E-09
Control (+)	T1	-50,1023	-46,6976	-43,2929	9,97E-09
Control (+)	T2	-27,125	-23,7203	-20,3156	9,97E-09
Control (+)	T3	-7,04633	-3,64165	-0,23696	0,032429
T1	T2	19,57266	22,97734	26,38203	9,97E-09
T1	T3	39,65129	43,05598	46,46066	9,97E-09
T2	T3	16,67395	20,07864	23,48332	9,97E-09

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la tabla 3-20 se observan los resultados de la prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición de laberinto en cruz elevado del parámetro tiempo en brazos cerrados. La actividad ansiolítica se evaluó según el tiempo de permanencia del ratón en esta área, al existir un elevado tiempo de permanencia indicaría que está más estresado, por ese motivo busca lugares cerrados y oscuros.

El blanco mostró diferencias estadísticas significativas con el control (+) (clonazepam 0.5mg/kg) y con los tratamientos T1, T2 y T3.

- **Tiempo en brazos abiertos**

Tabla 22-3: Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado. Parámetro tiempo en brazos abiertos.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	-54,545	-48,4859	-42,4267	9,97E-09
Blanco	T2	-14,1722	-8,11309	-2,05395	0,00555
Blanco	T3	-46,9343	-40,8751	-34,816	9,97E-09
Control (+)	T1	45,61341	51,67256	57,7317	9,97E-09
Control (+)	T2	34,31364	40,37278	46,43193	9,97E-09
Control (+)	T3	1,551622	7,610769	13,66992	0,009656
T1	T2	-17,3589	-11,2998	-5,24063	0,000161
T1	T3	-50,1209	-44,0618	-38,0026	9,97E-09
T2	T3	-38,8212	-32,762	-26,7029	9,97E-09

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 3-21 mostró los resultados de la prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo de medición de laberinto en cruz elevado del parámetro tiempo en brazos abiertos, obtenidos a través del software ANXIOLITIC LAB, en este parámetro se evaluó el nivel de ansiedad del ratón según el tiempo de permanencia en esta área, un elevado tiempo de permanencia del ratón en esta área significa que el ratón está relajado.

El control (+) (clonazepam 0.5mg/kg) mostró diferencias significativas con los tratamientos T1, T2 y T3 por lo que se concluye que los tres tratamientos interfieren en el estado ansioso del ratón, ninguno al nivel del control, aunque si se demostró que los extractos vegetales interfieren para disminuir el estado de ansiedad del ratón.

- **Tiempo en el centro**

Tabla 23-3: Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado. Parámetro tiempo en el centro.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	-19,289	-12,5127	-5,73633	0,000182
Blanco	T3	-23,4104	-16,634	-9,85766	3,89E-06
Control (+)	T1	6,537562	13,31391	20,09026	8,38E-05
T1	T2	-14,0737	-7,29734	-0,52099	0,030969
T1	T3	-24,2116	-17,4352	-10,6589	1,93E-06
T2	T3	-16,9143	-10,1379	-3,36156	0,001922

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la tabla 3-22 se observan los resultados de la prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado del parámetro tiempo en el centro, datos obtenidos a través del software ANXIOLITIC LAB, este parámetro al igual que el anterior evalúa la ansiedad del ratón, a mayor tiempo de permanencia significa que está relajado y explorando el nuevo ambiente.

El blanco mostró diferencias estadísticas significativas con todos los tratamientos. Mientras que, el control solo mostró diferencias estadísticas significativas con el tratamiento T1, esto puede deberse a la baja concentración del extracto que se usó.

- **Distancia recorrida**

Tabla 24-3: Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado. Parámetro distancia recorrida.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	9,057665	11,24326	13,42886	9,98E-09
Blanco	T1	0,146033	2,331631	4,517228	0,033003
Blanco	T2	3,837663	6,02326	8,208858	6,81E-07
Blanco	T3	9,217398	11,403	13,58859	9,98E-09
Control (+)	T1	-11,0972	-8,91163	-6,72603	1,09E-08
Control (+)	T2	-7,4056	-5,22	-3,0344	5,8E-06
T1	T2	1,506032	3,69163	5,877227	0,000522
T1	T3	6,885767	9,071365	11,25696	1,07E-08
T2	T3	3,194137	5,379735	7,565333	3,74E-06

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 3-23 presenta los resultados de la prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado del parámetro distancia recorrida, lo que mide este parámetro es la actividad locomotora del ratón por medio de la distancia que recorre, cuanto más alto sea este número, el ratón tiene un mejor movimiento en su traslado de un lugar a otro.

El blanco presentó diferencias estadísticas con el control y con los tratamientos T1, T2 y T3 lo que quiere decir que todas las dosis investigadas influyen en diferente medida en la actividad locomotora del ratón.

El control no evidenció diferencias estadísticas con el tratamiento T3, pero si con los tratamientos T1 y T2, lo que demuestra que T3 interfiere en la actividad locomotora del ratón en un nivel similar al del control (+).

- **Velocidad media**

Tabla 25-3: Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado. Parámetro velocidad media.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	0,030192	0,037478	0,044763	9,98E-09
Blanco	T1	0,000487	0,007772	0,015057	0,033003
Blanco	T2	0,012792	0,020078	0,027363	6,81E-07
Blanco	T3	0,030725	0,03801	0,045295	9,98E-09
Control (+)	T1	-0,03699	-0,02971	-0,02242	1,09E-08
Control (+)	T2	-0,02469	-0,0174	-0,01011	5,8E-06
T1	T2	0,00502	0,012305	0,019591	0,000522
T1	T3	0,022953	0,030238	0,037523	1,07E-08
T2	T3	0,010647	0,017932	0,025218	3,74E-06

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la tabla 3-24 se observan los resultados de la prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición de laberinto en cruz elevada del parámetro velocidad media, la motricidad del ratón se determina en cuanto más elevado sea el número.

El blanco mostró diferencias estadísticas significativas con el control (+) (clonazepam 0.5mg/kg) y con los tratamientos T1 (150ppm), T2 (200ppm) y T3 (250ppm) lo que significa que los tres tratamientos van a interferir en la motricidad natural del ratón.

El control (+) mostró diferencias significativas con los tratamientos T1 y T2, pero no mostró diferencia estadística con el tratamiento T3 por lo que se concluyó que este tratamiento muestra una actividad similar al clonazepam.

3.6.3. Equipo electrónico de medición Campo abierto

3.6.3.1. Prueba de normalidad

Tabla 26-3: Prueba de normalidad mediante la prueba Lilliefors para el equipo electrónico de medición campo abierto.

Distancia Recorrida				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,5	0,2192	0,3431
Control (+)	0	0,5	0,2061	0,3431
T1	0	0,5	0,1758	0,3431
T2	0	0,5	0,2008	0,3431
T3	0	0,159	0,3	0,3431
Velocidad Media				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,11345331	0,31396974	0,3431
Control (+)	0	0,5	0,21676319	0,3431
T1	0	0,5	0,17398479	0,3431
T2	0	0,5	0,22427132	0,3431
T3	0	0,5	0,21072212	0,3431
N° Defecaciones				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,46935425	0,23713951	0,3431
Control (+)	0	0,5	0,23051008	0,3431
T1	0	0,15897855	0,3	0,3431
T2	0	0,5	0,23051008	0,3431
T3	0	0,5	0,23051008	0,3431
N° Elevaciones				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,5	0,2184877	0,3431
Control (+)	0	0,5	0,22406011	0,3431
T1	0	0,3417045	0,25874778	0,3431
T2	0	0,2122691	0,28649766	0,3431
T3	0	0,37422905	0,2525567	0,3431
Tiempo Total en Esquinas				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,3361629	0,25984137	0,3431
Control (+)	0	0,43490632	0,24220414	0,3431
T1	0	0,5	0,21680879	0,3431
T2	0	0,5	0,19229001	0,3431
T3	0	0,33715881	0,25964405	0,3431
Tiempo Total en Lados				

	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,42749891	0,24337479	0,3431
Control (+)	0	0,19487216	0,29049899	0,3431
T1	0	0,41904896	0,37711609	0,3431
T2	0	0,48415365	0,23516721	0,3431
T3	0	0,5	0,19450335	0,3431
Tiempo Total en el Interior				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,46782723	0,23735021	0,3431
Control (+)	0	0,19728113	0,2899298	0,3431
T1	0	0,24599169	0,2789064	0,3431
T2	0	0,2982739	0,26758516	0,3431
T3	0	0,12306493	0,31076582	0,3431
Tiempo Total en el Centro				
	Hipótesis (h)	Valor P	Estadístico D	Valor Crítico
Blanco	0	0,49607524	0,23367294	0,3431
Control (+)	0	0,38232709	0,25107996	0,3431
T1	0	0,5	0,18525507	0,3431
T2	0	0,5	0,22488047	0,3431
T3	0	0,5	0,22207332	0,3431

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

(H₀) Si H=0: Los datos provienen de una distribución normal.

(H_a) Si H=0: Los datos no provienen de una distribución normal.

La tabla 3-25 presenta los resultados obtenidos de la prueba de normalidad mediante el test de Lilliefors para los siguientes parámetros del equipo electrónico de medición campo abierto: distancia recorrida, velocidad media, número de defecaciones, número de elevaciones, tiempo total en esquinas, tiempo total en lados, tiempo total en el interior y tiempo total en el centro.

Los datos que se obtuvieron por medio del equipo electrónico de medición campo abierto cumplen con la prueba de normalidad ya que la hipótesis de todos los parámetros es cero.

3.6.3.2. Prueba de homogeneidad de varianzas

Tabla 27-3: Prueba de homogeneidad de varianzas mediante el Test de Levene para el equipo electrónico de medición campo abierto.

Distancia Recorrida	
Valor P	0,96122555
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	0,14912289
Velocidad Media	

Valor P	0,96283389
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	0,14560798
N° Defecaciones	
Valor P	0,66558544
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	0,60200669
N° Elevaciones	
Valor P	0,79622205
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	0,41439304
Tiempo Total en Esquinas	
Valor P	0,65410943
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	0,61903008
Tiempo Total en Lados	
Valor P	0,19038301
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	1,53630269
Tiempo Total en el Interior	
Valor P	0,39986837
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	1,06450287
Tiempo Total en el Centro	
Valor P	0,16603531
dF1	4
dF2	20
Observaciones:	1,81246237

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 3-26 muestra los resultados de la prueba de homogeneidad de varianza por medio del test de Levene para el equipo de medición campo abierto con un nivel de significancia de 0.05 para todos los parámetros: distancia recorrida, velocidad media, número de defecación, número de elevaciones, tiempo total en esquinas, tiempo total en lados, tiempo total en el interior, y tiempo total en el centro.

Según los resultados se determinó que los valores de P obtenidos mediante el software ANXIOLITIC LAB son mayores que el nivel de significancia (0.05), determinando así que existió una igualdad de varianzas en los tratamientos para todos los parámetros.

3.6.3.3. Prueba de ANOVA de un factor

Tabla 28-3: Prueba de ANOVA de un factor para el equipo electrónico de medición campo abierto.

Tabla ANOVA - Distancia Recorrida					
Source	SS	Df	MS	F	Prob>F
Columns	7344,92082	4	1836,23021	177,09264	2,6133E-15
Error	207,375101	20	10,3687551		
Total	7552,29592	24			
Tabla ANOVA - Velocidad Media					
Source	SS	Df	MS	F	Prob>F
Columns	0,02271086	4	0,00567771	163,129118	5,7911E-15
Error	0,0006961	20	3,4805E-05		
Total	0,02340696	24			
Tabla ANOVA - N° Defecaciones					
Source	SS	Df	MS	F	Prob>F
Columns	92,56	4	23,14	29,6666667	3,7233E-08
Error	15,6	20	0,78		
Total	108,16	24			
Tabla ANOVA - N° Elevaciones					
Source	SS	Df	MS	F	Prob>F
Columns	3529,44	4	882,36	90,2208589	1,6693E-12
Error	195,6	20	9,78		
Total	3725,04	24			
Tabla ANOVA - Tiempo Total en Esquinas					
Source	SS	Df	MS	F	Prob>F
Columns	46265,9822	4	11566,4956	1329,5546	5,9738E-24
Error	173,990531	20	8,69952655		
Total	46439,9728	24			
Tabla ANOVA - Tiempo Total en Lados					
Source	SS	Df	MS	F	Prob>F
Columns	149921,95	4	37480,4875	177,919136	2,4979E-15
Error	4213,20477	20	210,660238		
Total	154135,155	24			
Tabla ANOVA - Tiempo Total en el Interior					
Source	SS	Df	MS	F	Prob>F
Columns	66233,8754	4	16558,4688	153,657313	1,0324E-14
Error	2155,24644	20	107,762322		
Total	68389,1218	24			

Tabla ANOVA - Tiempo Total en el Centro					
Source	SS	Df	MS	F	Prob>F
Columns	22382,4683	4	5595,61708	563,459519	3,0242E-20
Error	198,616472	20	9,93082358		
Total	22581,0848	24			

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 3-27 mostró los resultados obtenidos mediante ANOVA de un factor para cada parámetro del equipo de medición de campo abierto a través de ANXIOLITIC LAB, los valores de Prob>F son menores que el nivel de significancia (0.05), lo que quiere decir que al menos existen dos tratamientos con medias diferentes en alguno de los parámetros.

3.6.3.4. Comparaciones múltiples a través del método Tukey

- **Distancia recorrida**

Tabla 29-3: Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto. Parámetro distancia recorrida.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	41,41903	47,51313	53,60722	9,97E-09
Blanco	T1	22,13963	28,23373	34,32782	1,01E-08
Blanco	T2	29,82411	35,91821	42,0123	9,97E-09
Blanco	T3	39,19663	45,29072	51,38482	9,97E-09
Control (+)	T1	-25,3735	-19,2794	-13,1853	8,35E-08
Control (+)	T2	-17,689	-11,5949	-5,50083	0,000126
T1	T2	1,590383	7,684479	13,77857	0,009348
T1	T3	10,9629	17,057	23,15109	5,37E-07
T2	T3	3,27842	9,372516	15,46661	0,001447

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 3-28 muestra los resultados de la prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto del parámetro distancia recorrida, este parámetro evaluó la motricidad del ratón según la distancia que recorre, cuanto más distancia recorra mejor capacidad motriz presentará.

El blanco mostró diferencias estadísticas significativas con el control (+) (clonazepam 0,5mg/kg) y con los tratamientos T1 (150ppm), T2 (200ppm) y T3 (250ppm), lo que muestra que los tres tratamientos actúan sobre los movimientos del roedor.

El control mostró diferencia estadística significativa con los tratamientos T1 y T2, pero no con el tratamiento T3, por lo que se concluyó que este tratamiento tiene un nivel de interferencia en la actividad motriz del ratón similar a la del clonazepam.

- **Velocidad media**

Tabla 30-3: Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto. Parámetro velocidad media.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	0,07252	0,083685	0,094851	9,97E-09
Blanco	T1	0,041513	0,052678	0,063843	1E-08
Blanco	T2	0,053957	0,065122	0,076288	9,97E-09
Blanco	T3	0,068193	0,079358	0,090523	9,97E-09
Control (+)	T1	-0,04217	-0,03101	-0,01984	6,05E-07
Control (+)	T2	-0,02973	-0,01856	-0,0074	0,000624
T1	T2	0,001279	0,012444	0,023609	0,02436
T1	T3	0,015514	0,02668	0,037845	5,76E-06
T2	T3	0,00307	0,014235	0,025401	0,008517

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 3-29 muestra los resultados de la prueba de comparaciones múltiples por medio del método Tukey para la prueba de campo abierto del parámetro velocidad media, en el cual se evaluó la actividad locomotora del ratón, cuanto más rápido sea este, tendrá una mejor locomoción.

El blanco reveló diferencias con el control (+) (clonazepam 0.5mg/kg) y con los tratamientos T1 (150ppm), T2 (200ppm) y T3 (250ppm), lo que significa que todos los tratamientos interfieren en la locomoción del ratón. Además, se determinó que el control (+) no tuvo diferencias estadísticas significativas con el tratamiento T3 lo que quiere decir que presenta efectos similares al clonazepam.

- **Número de defecaciones**

Tabla 31-3: Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto. Parámetro número de defecaciones.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	1,72855	3,4	5,07145	5,34E-05
Blanco	T3	1,72855	3,4	5,07145	5,34E-05
Control (+)	T1	-6,47145	-4,8	-3,12855	3,61E-07
Control (+)	T2	-4,67145	-3	-1,32855	0,000257
T1	T2	0,12855	1,8	3,47145	0,030964
T1	T3	3,12855	4,8	6,47145	3,61E-07
T2	T3	1,32855	3	4,67145	0,000257

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 3-30 presenta los resultados de la prueba de comparaciones múltiples mediante el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo del parámetro número de defecaciones, que evalúa el nivel de ansiedad del ratón, mientras más elevado sea este número mayor es la ansiedad del ratón.

El blanco mostró diferencias estadísticas significativas con el grupo control (+) (clonazepam 0,5mg/kg) y el tratamiento T3, demostrando que entre estos dos parámetros existió un nivel de interferencia sobre la ansiedad del ratón.

El control (+) mostró diferencias significativas con el tratamiento T1 y T2, demostrando un nivel mínimo de interferencia en la ansiedad del ratón, evidenciándose la actividad ansiolítica en el tratamiento T3 ya que el número de defecaciones fue parecido al del grupo control.

- **Número de elevaciones**

Tabla 32-3: Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto. Parámetro número de elevaciones.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	-33,5186	-27,6	-21,6814	1E-08
Blanco	T2	-15,3186	-9,4	-3,48145	0,00103
Blanco	T3	-33,9186	-28	-22,0814	1E-08

Control (+)	T1	18,08145	24	29,91855	1,1E-08
Control (+)	T2	12,28145	18,2	24,11855	1,27E-07
T1	T3	-30,3186	-24,4	-18,4814	1,07E-08
T2	T3	-24,5186	-18,6	-12,6814	9,19E-08

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 32-3 presenta los resultados de la prueba de comparaciones múltiples mediante el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto en el parámetro número de elevaciones, este parámetro evaluó la ansiedad del ratón, mientras más elevaciones existan, mayor es el nivel de ansiedad del ratón.

El blanco mostró diferencias estadísticas significativas con el control (+) (clonazepam 0.5mg/kg) y con los tratamientos T2 (ppm) y T3 (ppm), debido a las concentraciones que se utilizaron en los diferentes tratamientos, existo un número menor de elevaciones, concluyendo que interfieren en menor medida en la ansiedad del ratón.

El control (+) no mostró diferencias estadísticas significativas con el tratamiento T3 por lo que se evidenció que existió una actividad ansiolítica parecida a la del clonazepam, concluyendo que este tratamiento disminuye el nivel de ansiedad, debido a que este tratamiento presenta la concentración más alta de los extractos.

- **Tiempo total en esquinas**

Tabla 33-3: Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto. Parámetro tiempo total en esquinas.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	92,46685	98,0489	103,631	9,97E-09
Blanco	T1	2,054696	7,636747	13,2188	0,004564
Blanco	T2	43,56133	49,14338	54,72543	9,97E-09
Blanco	T3	95,96652	101,5486	107,1306	9,97E-09
Control (+)	T1	-95,9942	-90,4122	-84,8301	9,97E-09
Control (+)	T2	-54,4876	-48,9055	-43,3235	9,97E-09
T1	T2	35,92458	41,50663	47,08868	9,97E-09
T1	T3	88,32977	93,91182	99,49387	9,97E-09
T2	T3	46,82314	52,40519	57,98724	9,97E-09

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 3-32 muestra los resultados de la prueba de comparaciones múltiples por medio del método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto, parámetro tiempo total en esquinas, en el cual se evaluó la ansiedad del ratón, cuanto más tiempo se encuentre en estas áreas mayor es la ansiedad del ratón.

El blanco mostró diferencias estadísticas significativas con el control (+) (clonazepam 0,5mg/kg) y con los tratamientos T1 (150ppm), T2 (200ppm) y T3 (250ppm), evidenciándose una posible actividad ansiolítica de los tres tratamientos.

El control mostró diferencias estadísticas significativa con los tratamientos T1, T2 esto quiere decir que hubo una baja actividad ansiolítica sin descartar su efectividad, mientras que el tratamiento T3 presentó una actividad ansiolítica similar a la del clonazepam.

- **Tiempo total en lados**

Tabla 34-3: Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto. Parámetro tiempo total en lados.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	148,6292	176,0978	203,5665	9,97E-09
Blanco	T2	76,41997	103,8886	131,3573	1,35E-08
Blanco	T3	142,9699	170,4386	197,9072	9,97E-09
Control (+)	T1	-201,936	-174,467	-146,999	9,97E-09
Control (+)	T2	-99,6779	-72,2092	-44,7406	1,4E-06
T1	T2	74,78932	102,258	129,7266	1,47E-08
T1	T3	141,3393	168,8079	196,2766	9,97E-09
T2	T3	39,08129	66,54994	94,01859	4,71E-06

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 3-33 presenta los resultados de la prueba de comparaciones múltiples mediante el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto en el parámetro tiempo en los lados.

El blanco mostró diferencias estadísticas significativas con el control (+) (clonazepam 0.5mg/kg) y con los tratamientos T2 y T3, lo que significa que existió una actividad ansiolítica de estos tratamientos debido a las concentraciones que se utilizaron en los extractos.

En control (+) no mostró diferencias estadísticas significativas con el tratamiento T3 lo que indica que este tratamiento presentó una actividad ansiolítica similar a la del clonazepam.

- **Tiempo total en el interior**

Tabla 35-3: Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto. Parámetro tiempo total en el interior.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	-124,252	-104,606	-84,9596	9,97E-09
Blanco	T2	-127,806	-108,159	-88,5132	9,97E-09
Blanco	T3	-129,584	-109,937	-90,2911	9,97E-09
Control (+)	T1	79,73223	99,37847	119,0247	9,98E-09
T1	T2	-122,578	-102,932	-83,2858	9,98E-09
T1	T3	-124,356	-104,71	-85,0637	9,97E-09

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

En la tabla 3-34 se observan los resultados de la prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto, parámetro tiempo total en el interior, esta variable evalúa la ansiedad del roedor, determinando que mientras el ratón busque zonas más cercanas al centro más relajado se encuentra.

El blanco mostró diferencias significativas con el control y con los tratamientos T2 y T3, por lo que se elimina la probabilidad de que el tratamiento T1 influya en la ansiedad del ratón.

El control mostró diferencias significativas con el tratamiento T1 lo que indicó que el tratamiento T2 y T3 pueden tener una actividad ansiolítica sobre el ratón similar al clonazepam, debido a que son los tratamientos con las concentraciones de los extractos más altas.

- **Tiempo total en el centro**

Tabla 36-3: Prueba de comparaciones múltiples por el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto. Parámetro tiempo total en el centro.

Comparaciones Múltiples Por Método de Tukey					
GRUPO A	GRUPO B	Intervalo de Confianza Inferior	Estimación	Intervalo de Confianza Superior	Valor P
Blanco	Control (+)	-68,2509	-62,2869	-56,3229	9,97E-09
Blanco	T2	-54,5193	-48,5553	-42,5913	9,97E-09
Blanco	T3	-73,2565	-67,2925	-61,3285	9,97E-09
Control (+)	T1	57,12036	63,08437	69,04838	9,97E-09
Control (+)	T2	7,767604	13,73162	19,69563	9,81E-06
T1	T2	-55,3168	-49,3528	-43,3887	9,97E-09
T1	T3	-74,054	-68,09	-62,1259	9,97E-09
T2	T3	-24,7012	-18,7372	-12,7732	9,24E-08

Realizado por: Albuja Alison, 2022.

La tabla 3-35 presenta los resultados de la prueba de comparaciones múltiples mediante el método Tukey para el equipo electrónico de medición campo abierto del parámetro tiempo total en el centro, como en la tabla anterior se evaluó la ansiedad del ratón. Cuanto más tiempo cerca del centro se encuentre existirá un nivel menor de ansiedad del ratón.

El blanco mostró diferencias significativas con el control y con los tratamientos T2 y T3 lo que significa que debido a las concentraciones de los extractos existiría una posible actividad ansiolítica.

El control no mostró diferencias significativas con el tratamiento T3, por lo que se concluyó que existió una actividad ansiolítica semejante a la del clonazepam. Ya que el animal estuvo un mayor tiempo en el centro explorando el ambiente.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados estadísticos que se obtuvieron durante la investigación acerca de la combinación de los extractos de *Lavandula sp* y *Citrus reticulata*, administrado en diferentes concentraciones en los grupos de estudio que se compararon con un blanco (agua) y un control (clonazepam), se determinó que esta combinación posee actividad ansiolítica. Esta actividad se debe a los metabolitos que se encontraron en las muestras vegetales principalmente flavonoides, fenoles, terpenos y alcaloides.

En el control de calidad que se realizó a las muestras vegetales *Lavandula sp* y *Citrus reticulata* los parámetros como humedad, cenizas totales y otros se encontraron dentro de los rangos permitidos según la USP 35, por lo que se concluyeron que las dos muestras vegetales eran óptimas para la investigación.

En el tamizaje fitoquímico realizado a los extractos de *Lavandula sp* y *Citrus reticulata* se identificaron los siguientes metabolitos: flavonoides, taninos, catequinas, mucílagos, triterpenos y esteroides, quinonas, antocianinas y azúcares reductores, siendo los fenoles y flavonoides compuestos fundamentales para que el material vegetal presente actividad ansiolítica.

Los resultados del análisis organoléptico de los extractos de las muestras vegetales son característicos para *Lavandula sp* y *Citrus reticulata* en los parámetros de color, aspecto y olor; mientras que difieren en el parámetro de sabor, esto se atribuye a los metabolitos secundarios que presentan cada una de muestras vegetales.

Los resultados estadísticos que se obtuvieron a partir del software ANXIOLITIC LAB de la combinación del extracto liofilizado de *Lavandula sp* y *Citrus reticulata* a diferentes concentraciones T1 (150 ppm), T2 (200 ppm) y T3 (250 ppm), mostraron que las concentraciones de 200ppm y 250ppm tienen actividad ansiolítica al ser las más altas, por otro lado, la concentración de 150ppm no presentó actividad ansiolítica ya que solo se evidenció diferencias estadísticas significativas con el blanco en el test de campo claro – oscuro.

Para el tratamiento T3 con la concentración de 250 ppm de la combinación de *Lavandula sp* y *Citrus reticulata* en la mayoría de los parámetros que se analizaron en los equipos electrónicos de medición no se presentaron diferencias estadísticas significativas con el control positivo, por lo que se concluyó que la actividad ansiolítica de este tratamiento es similar a la del clonazepam. Cabe señalar que se presentaron efectos sobre la locomoción del ratón en los tres tratamientos.

RECOMENDACIONES

Es importante que la investigación cumpla varios criterios estrictos respecto al ambiente en el que se mantendrá a los animales de experimentación (ratones), ya que cualquier alteración en sus condiciones externas puede modificar los resultados que se obtengan, ya que influyen en su nivel de ansiedad.

Se recomienda realizar un estudio comparativo de las mismas especies vegetales usadas en esta investigación, es decir, *Lavandula sp* y *Citrus reticulata* pero de manera individual, y así reconocer cuál de las dos especies tiene mayor actividad ansiolítica.

Para este tipo de investigaciones experimentales con animales es importante tener en cuenta que se debe mantener homogeneidad en el grupo de estudio, para así minimizar las variables externas que podrían alterar los resultados que se obtengan en la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA. *El trastorno de ansiedad generalizada.* Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM. 2013, Vol. 56, 4, p. 53-55.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Suplemento del manual de diagnóstico y estadísticos de trastornos mentales. Quinta.* Washington, DC : American Psychiatric Association, 2018.

ARANGO, Cesar & RINCÓN, Hernán. *Trastorno depresivo, trastorno de ansiedad y dolor crónico: múltiples manifestaciones de un núcleo fisiopatológico y clínico común.* Revista Colombiana de Psiquiatría. 2018, Vol. 41, 1, pp. 46-55.

ASOCIACIÓN AMERICANA DE PSIQUIATRÍA. *Guía de consultade de los criterios diagnósticos del DSM-5.* Arlington, VA : Asociación Americana de Psiquiatría, 2014. ISBN 978-0-89042-551-0.

CASAMAYOR, Dianelis, et. al. *Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional.* MEDISAN. 2014, Vol. 18, 10, pp. 1467-1474.

CEBADERA, Laura. *Valoración nutricional, compuestos bioactivos y actividad antioxidante de cítricos: Clementinas y Naranjas Pigmentadas.* Universidad Complutense de Madrid. Madrid : s.n., 2017. Tesis doctoral. ISBN: 978-84-697-2606-8.

DE SANTIS, Agustina. *Modulación farmacológica del SNC: fármacos ansiolíticos y antidepresivos.* [En línea] 2018. [Citado el: 25 de abril de 2021.] http://www.farmacologia.hc.edu.uy/images/EUTM_ansiol%C3%ADticos_y_antidepresivos.pdf.

DURÁN, Ricardo, et. al. *Aceite Esencial Obtenido de Cáscaras de Naranja en Diferentes Estados de Madurez de dos Cultivos en el Municipio de Chimichagua, Colombia.* Revista Alimentos Hoy. 2012, Vol. 21, 26, pp. 60-70.

ELSEVIER INTERACTIVE PATIENT EDUCATION. *Trastorno de ansiedad generalizada, en adultos.* [En línea] 2020. [Citado el: 12 de junio de 2021.]

https://www.elsevier.com/__data/assets/pdf_file/0019/1008820/Trastorno-de-ansiedad-generalizada,-en-adultos_230318.pdf.

ESCAMILLA, Blanca, et. al. *Plantas medicinales de la Matamba y El Piñoral, municipio de Jamapa, Veracruz*. Veracruz : Instituto de Ecología A. C. (INECOL) , 2015. ISBN 978-607-7579-44-1.

FAJARDO, Laura. *Efecto de los aceites esenciales en los síntomas emocionales de la ansiedad, depresión y estrés una revisión literaria*. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. 2018. Tesis de grado.

FERNÁNDEZ, Odalis, et. al. *Manual para diagnóstico y tratamiento de trastornos ansiosos*. Revista Electrónica de las Ciencias Médicas en Cienfuegos. 2012, Vol. 10, 5, pp. 466-479.

FLEMIN, Sean. *Este es el mayor problema de salud mental del mundo, y es posible que no haya oído hablar de él*. [En línea] 2019. [Citado el: 3 de mayo de 2021.] <https://es.weforum.org/agenda/2019/01/este-es-el-mayor-problema-de-salud-mental-del-mundo-y-es-posible-que-no-haya-oido-hablar-de-el/>.

FLOREZ, J. *Fármacos ansiolíticos y antidepresivos*. s.l. 6ª edición, Editorial Masson, 2018, p. 32.

FLÓREZ, Jesús, ARMIJO, Juan & MEDIAVILLA, África. *Farmacología Humana*. Sexta. Amsterdam : Elseiver, 2014. ISBN: 9788445823163.

GÓMEZ, Adela. *Trastornos de ansiedad. Agorafobia y crisis de pánico*. Farmacia Profesional. Economía y Gestión. 2012, Vol. 26, 6, pp. 32-39.

GONÇALVES, Sandra & ROMANO, Anabela. *In vitro culture of lavenders (Lavandula spp.) and the production of secondary metabolites*. Biotechnology Advances. 2012.

GONZÁLEZ, Luis & TULLO, Cirilo. *Guía Técnica. Cultivo de Cítricos*. San Lorenzo : Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción, 2019. ISBN 978-99967-940-3-2.

GRANADOS, Jorge. *Uso de animales de experimentación en la investigación biomédica en Costa Rica*. Acta Médica Costarricense. 2010, Vol. 52, 3, pp. 134-136.

HOLLANDER, E. & SIMEON, D. *Guía de Trastornos de ansiedad*. Madrid-España. Elsevier. : s.n., 2015, p. 144.

KASPER, Siegfried, et. al. *Lavender oil preparation Silexan is effective in generalized anxiety disorder – a randomized, double-blind comparison to placebo and paroxetine*. Int J Neuropsychopharmacol. 2018, Vol. 17, 6, pp. 59-69.

LARA, Mercedes. *Uso de plantas medicinales como tranquilizante en la parroquia Marcos Espinel del cantón Santiago de Pillaro*. Universidad Técnica de Ambato. Ambato : s.n., 2018. Tesis de grado.

LÓPEZ, Ana, et. al. *Uso y abuso de las benzodiazepinas*. MEDISAN. 2010, Vol. 14, 4, p. 555-566.

LÓPEZ, Francisco, et. al. *Métodos de extracción e identificación de los bioactivos de la Lavandula officinalis y su potencial uso como agente sedante*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2013, Vol. 44, 1, p. 60-65.

LÓPEZ, María, et. al. *Determinación del Efecto Ansiolítico de La Infusión de Mentha Piperita en Ratones mediante la prueba del laberinto elevado en Cruz*. Discover Medicine. 2017, Vol. 1, 2, pp. 21-28.

MAHAJAN, Vinay, et. al. *Los fenotipos inmunes llamativos en ratones dirigidos a diversos genes son impulsados por una variante del número de copias que se origina a partir de una cepa C57BL / 6 disponible comercialmente*. Cell Rep. 2016, Vol. 15, 9, pp. 1901-1909.

MARQUÉS, Manuel. *Composición química de los aceites esenciales de Lavanda y Tomillo. Determinación de la actividad antifúngica*. Universitat Politècnica de València. Valencia : s.n., 2015. Tesis de grado.

MARTÍNEZ, Mayra & LÓPEZ, David. *Trastornos de ansiedad*. Revista Neurología, Neurocirugía y Psiquiatría. 2011, Vol. 44, 3, pp. 101-107.

MOLINA, José, et. al. *Bioética en la Experimentación Animal*. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria. 2015, Vol. 16, 2, pp. 1-19.

MOMOX, L. *Importancia, beneficios y ética de la experimentación animal*. 2016.

MORENO, David, et. al. *Implementación de sistemas evaluadores de conducta ansiolítica en ratones de laboratorio utilizando procesamiento digital de imágenes.* MASKAY. 2018, Vol. 8, 1, pp. 27-34.

NILSSON, Cecilia, et. al. *Los animales de laboratorio como modelos sustitutos de la obesidad humana.* Acta Pharmacol Sin. 2012, Vol. 33, 2, pp. 173-181.

OCAMPO, Juan, et. al. *Características Morfocuantitativas de la Glándula Submandibular de Ratón (*Mus musculus*).* International Journal of Morphology. 2020, Vol. 38, 3, pp. 570-577.

OPS. *Organización panamericana de la Salud. Trastornos de ansiedad.* [En línea] 2017. [Citado el: 1 de mayo de 2021.] <https://www.paho.org/es/temas/salud-mental>.

OPS & OMS. *La carga de los trastornos mentales en la Región de las Américas, 2018.* Washington, D.C. : PAHO, 2018. ISBN: 978-92-75-32028-0.

PÉREZ, Gimena & GONZÁLEZ, María. *Plantas medicinales contra la ansiedad.* Ciencia. 2015, Vol. 66, 3.

PÉREZ, Macarena. *Psicofarmacología de la ansiedad.* Universidad de Jaén. Jaén : s.n., 2014. Tesis de grado.

PÉREZ, Octavio. *Concentración nutrimental en hojas de naranjo Valencia injertado en portainjertos de cítricos Terra Latinoamericana.* Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. 2005, Vol. 23, 1, pp. 39-47.

PÉREZ, R. *Los trastornos de la ansiedad, como problema masivo del mundo actual y la búsqueda de programas terapéuticos específicos.* Cuba. : s.n., 2016.

RAMÍREZ, Bernardo & GOYES, Rosa. *Botánica. Generalidades, Morfología y anatomía de las plantas superiores.* Cali : Universidad del Cauca, 2004. ISBN 958-9475-43-4.

ROJAS, Enrique. *Cómo superar la Ansiedad.* Editorial Planeta, S. A : Barcelona, 2014. ISBN: 978-84-9998-449-0.

ROMERO, Brenda, GUTIÉRREZ, María & FIGUEROA, María. *La ética y el uso de animales en la experimentación.* Revista de Hospital Juárez de México. 2017, Vol. 84, 2, pp. 60-62.

ROMERO, Wilber, et. al. *El 1, 2, 3 de la experimentación con animales de laboratorio.* Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2016, Vol. 33, 2, pp. 288-299.

SARUDIANSKY, Mercedes. *Ansiedad, angustia y neurosis.* Antecedentes conceptuales e históricos. 2013, Vol. 21, 2, pp. 19-28.

SAUNT, J. *Variedades de cítricos del mundo.* Vlencia : Editorial Sinclair, 2016.

SCHNAAS, Francisco. *Avances en el diagnóstico y tratamiento de la ansiedad y la depresión.* Neurología, Neurocirugía y Psiquiatría. 2017, Vol. 45, 1, pp. 22-25.

STACEY, Andrés. *Estudio y análisis de la variedad de mandarina tipo comúnde Ecuador y propuesta gastronómica de autor.* Universidad Internacional del Ecuador. Quito : s.n., 2014. Tesis de ingeniería.

TORAL, I, et. al. *Análisis de consumo de ansiolíticos e hipnóticos en un centro de atención primaria.* Medicina de familia de Andalucía. 2019, Vol. 20, 1, pp. 21-28.

TUSEV, Aleksandar, TONON, Luis & CAPELLA, Manuel. *Efectos Iniciales en la Salud Mental por la Pandemia de Covid-19 en algunas Provincias de Ecuador.* Investigatio. 2020, 15, pp. 11-24.

WELLNESS, Women's Health *Ansiedad y ataques de panico .* [En línea] EBSCO, Febrero de 2018. [Citado el: 8 de Enero de 2022.] <https://www.empowher.com/media/reference/ansiedad-y-ataques-de-panico>.

ANEXOS

ANEXO A: RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL



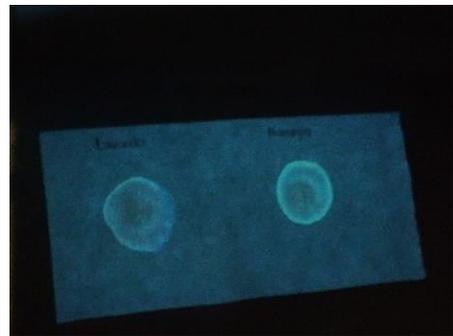
ANEXO B: SECADO Y MOLIENDA DEL MATERIAL VEGETAL



ANEXO C: DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y CENIZAS TOTALES



ANEXO D: TAMIZAJE FITOQUÍMICO



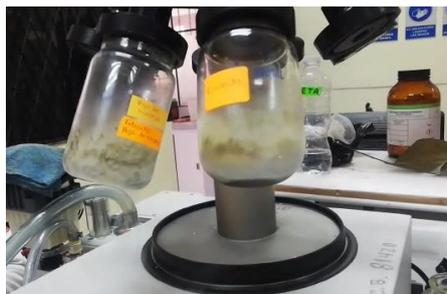
ANEXO E: CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO



ANEXO F: CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO



ANEXO G: LIOFILIZACIÓN



ANEXO H: CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES Y FLAVONOIDES TOTALES

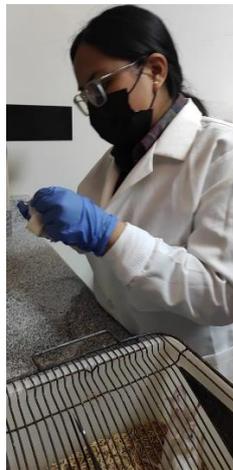


ANEXO I: AMBIENTACIÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN RATONES

(Mus musculus)



ANEXO J: ADMINISTRACIÓN DE SOLUCIONES EN LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN



ANEXO K: EQUIPOS UTILIZADOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA



ANEXO L: SOFTWARE UTILIZADO PARA EL PROCESAMIENTO DE IMÁGENES Y DATOS



ANEXO M: INDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE *LAVANDULA SP* Y *CITRUS RETICULATA*

