



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

## **FACULTAD DE CIENCIAS**

### **ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

#### **“ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANSIOLÍTICA *in vivo* DEL CANAYUYO (*Sonchus oleraceus*)”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

### **BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTOR: EDISSON MAURICIO ORNA GAMBOA**

**TUTOR: BQF. DIEGO VINUEZA TAPIA M.Sc.**

Riobamba-Ecuador

2015

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

El tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANSIOLÍTICA *in vivo* DEL CANAYUYO (*Sonchus oleraceus*)”, de responsabilidad del señor Edison Mauricio Orna Gamboa, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Vinuesa M.Sc.  
**DIRECTOR DE TESIS**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

BQF. Fausto Contero  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Lcda. Karen Acosta  
**PRESIDENTE TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**NOTA TRABAJO ESCRITO**

.....

.....  
**DOCUMENTALISTA SISBIB ESPOCH**

Yo, Edison Mauricio Orna Gamboa soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la Escuela Superior Politécnica De Chimborazo

---

EDISSON MAURICIO ORNA GAMBOA

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme la vida y permitirme haber alcanzado mis metas, por haberme brindado la oportunidad de crecer como ser humano y nunca dejarme caer a pesar de las circunstancias adversas.

A mis padres a quien les debo todo lo que soy y lo que tengo, mi madre un ejemplo de fortaleza y la mujer que más admiro en el mundo, mi padre de quien herede mi carácter, mi manera de pensar y hacer las cosas, a mi hermana quien gracias a ella brilla la luz de Dios en nuestro hogar y por último a mi hermano pequeño Kevin la persona que más quiero en este mundo.

A mis amigos quienes de una u otra manera son partícipes de este logro, por forma parte de los buenos y malos momentos a lo largo de mi carrera universitaria.

Y a ti VS gracias por toda tu ayuda y por hacer de estos últimos meses los mejores de mi vida.

## **AGRADECIMIENTO**

El más sincero agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por brindarme no solo el orgullo de mi formación profesional sino también como ser humano.

A Diego Vinueza más que mi tutor un amigo que supo orientarme en cada momento de duda, darme un aliento en cada momento de cansancio y sobre todo por todas sus enseñanzas, consejos y momentos compartidos.

A Fausto Contero una persona admirable de quien me llevo grandes enseñanzas y de quien siempre estaré agradecido por su tiempo y apoyo.

Mauro

## TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN.....	xvi
SUMARY.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>CAPITULO I</b>	
<b>1. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>3</b>
1.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación.....	3
1.2. Antecedentes de la Investigación.....	3
1.3. Bases teóricas.....	6
1.3.1. <i>Ansiedad</i> .....	6
1.3.1.1. <i>Manifestaciones Clínicas</i> .....	7
1.3.1.2. <i>Causas de los trastornos de ansiedad</i> .....	9
1.3.2. <i>Tipos de ansiedad</i> .....	9
1.3.2.1. <i>Trastorno de ansiedad generalizada</i> .....	11
1.3.2.1.1. <i>Epidemiología y evolución</i> .....	12
1.3.2.2. <i>Trastorno de angustia y crisis de pánico</i> .....	12
1.3.2.2.1. <i>Epidemiología y evolución</i> .....	13
1.3.2.3. <i>Fobias</i> .....	14
1.3.2.3.1. <i>Fobia social</i> .....	14
1.3.2.3.2. <i>Fobia específica</i> .....	15
1.3.2.3.3. <i>Agorafobia</i> .....	16
1.3.2.4. <i>Trastorno de estrés post-traumático</i> .....	16
1.3.2.5. <i>Trastorno obsesivo compulsivo</i> .....	17
1.3.2.5.1. <i>Epidemiología y evolución</i> .....	18
1.3.3. <i>Mecanismos neuropsicofisiológicos</i> .....	18
1.3.4. <i>Tratamiento de la ansiedad</i> .....	22
1.3.4.1. <i>Alternativas terapéuticas</i> .....	23
1.3.4.1.1. <i>Terapia psicológica</i> .....	23
1.3.4.1.2. <i>Farmacoterapia</i> .....	24
1.3.5. <i>Modelos animales para el estudio de ansiedad</i> .....	42
1.3.5.1. <i>Modelos de respuesta condicionada</i> .....	42
1.3.5.2. <i>Modelos de respuesta no condicionada</i> .....	43

<b>1.3.6.</b>	<b>Canayuyo (<i>Sonchus oleraceus</i>).....</b>	<b>46</b>
1.3.6.1.	<i>Clasificación taxonómica.....</i>	46
1.3.6.2.	<i>Nombres populares.....</i>	47
1.3.6.3.	<i>Historia.....</i>	47
1.3.6.4.	<i>Descripción Botánica.....</i>	48
1.3.6.5.	<i>Hábitat.....</i>	49
1.3.6.6.	<i>Parte utilizada.....</i>	49
1.3.6.7.	<i>Composición química.....</i>	50
1.3.6.8.	<i>Parte utilizada.....</i>	50
<b>1.3.7.</b>	<b><i>Mus musculus.....</i></b>	<b>51</b>
1.3.7.1.	<i>Clasificación taxonómica.....</i>	51
1.3.7.2.	<i>Características generales.....</i>	51
1.3.7.3.	<i>Comportamiento.....</i>	51

## CAPÍTULO II

<b>2.</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO.....</b>	<b>53</b>
2.1.	<b>Lugar de investigación.....</b>	<b>53</b>
2.2.	<b>Recolección del material vegetal.....</b>	<b>53</b>
2.3.	<b>Identificación botánica.....</b>	<b>53</b>
2.4.	<b>Secado y molienda.....</b>	<b>55</b>
2.5.	<b>Elaboración del extracto.....</b>	<b>55</b>
2.6.	<b>Métodos físico-químicos aplicados al análisis de drogas crudas. Parámetros de control de la calidad.....</b>	<b>55</b>
2.6.1.	<i>Determinación del contenido de humedad.....</i>	<i>56</i>
2.6.2.	<i>Determinación de cenizas totales.....</i>	<i>56</i>
2.6.2.1.	<i>Metodología experimental.....</i>	<i>57</i>
2.6.2.2.	<i>Expresión de resultados.....</i>	<i>57</i>
2.6.3.	<b><i>Cenizas Solubles en agua.....</i></b>	<b><i>57</i></b>
2.6.3.1.	<i>Metodología Experimental.....</i>	<i>58</i>
2.6.3.2.	<i>Expresión de resultados.....</i>	<i>58</i>
2.6.4.	<b><i>Cenizas insolubles en ácido clorhídrico.....</i></b>	<b><i>58</i></b>
2.6.4.1.	<i>Metodología experimental.....</i>	<i>59</i>
2.6.4.2.	<i>Expresión de resultados.....</i>	<i>59</i>
2.7.	<b><i>Análisis Cualitativo.....</i></b>	<b><i>60</i></b>

2.8.	Análisis TLC.....	62
2.9.	Análisis espectral y Cuantificación de Flavonoides totales .....	62
2.10.	Análisis HPLC.....	65
2.10.1.	<i>Preparación de las soluciones de trabajo</i> .....	65
2.10.2.	<i>Preparación de la muestra problema</i> .....	65
2.11.	Evaluación de la actividad citotóxica.....	65
2.12.	Evaluación de la actividad ansiolítica.....	68
2.12.1.	<i>Laberinto en Cruz elevado (EPM)</i> .....	68
2.12.2.	<i>Ensayo de Campo Abierto (OFT)</i> .....	69
2.13.	Evaluación de la acción Gabaérgica.....	69
2.14.	Análisis estadístico.....	70

### CAPÍTULO III

3.	<b>MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	71
3.1.	<i>Control de calidad de la droga cruda</i> .....	71
3.2.	<i>Análisis cualitativo</i> .....	72
3.3.	<i>Análisis de cromatografía en capa fina CCF</i> .....	74
3.4.	Análisis espectroscópico.....	75
3.5.	Análisis HPLC.....	82
3.6.	Evaluación de la citotoxicidad en neutrófilos aislados.....	85
3.7.	Evaluación del efecto ansiolítico.....	87
3.7.1.	<i>Ensayo de Laberinto elevado (EPM)</i> .....	88
3.7.1.1.	<i>Análisis estadístico</i> .....	90
3.7.1.1.1.	Análisis de varianza del Tiempo total de permanencia en los brazos abiertos.....	90
3.7.1.1.2.	Análisis de varianza del número total de entradas en los brazos abiertos.....	91
3.7.1.1.3.	Análisis de varianza del número total de entradas en el laberinto.....	92
3.7.2.	<i>Ensayo de campo abierto (OFT)</i> .....	94
3.7.2.1.	<i>Análisis estadístico</i> .....	96
3.7.2.1.1.	Análisis de varianza del número de entradas a la zona central del modelo.....	96
3.7.2.1.2.	Análisis de varianza del número de entradas a la periferie del modelo.....	97
3.7.2.1.3.	Análisis de varianza del tiempo de permanencia en la zona central del modelo.....	98



<b>3.7.3.</b>	<b><i>Evaluación de la actividad Gabaérgica en el modelo EPM</i></b> .....	<b>99</b>
<b>3.7.3.1.</b>	<i>Análisis estadístico</i> .....	102
<b>3.7.3.1.1.</b>	Análisis de varianza del Tiempo total de permanencia en los brazos abiertos.....	102
<b>3.7.3.1.2.</b>	Análisis de varianza del número de entradas en los brazos abiertos.....	103
<b>3.7.3.1.3.</b>	Análisis de varianza del número de entradas totales en el laberinto.....	104
<b>3.7.4.</b>	<b><i>Evaluación de la actividad Gabaérgica en el modelo OFT</i></b> .....	<b>107</b>
<b>3.7.4.1.</b>	<i>Análisis estadístico</i> .....	109
<b>3.7.4.1.1.</b>	Análisis de varianza del número de entradas a la zona central del modelo.....	109
<b>3.7.4.1.2.</b>	Análisis de varianza del número de entradas a la periferie del modelo.....	110
<b>3.7.4.1.3.</b>	Análisis de varianza del tiempo de permanencia total en la zona central del modelo.....	111
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>113</b>
	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>114</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
	<b>ANEXOS</b>	

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1.</b>	Síntomas de los trastornos de ansiedad. Tomada de Escamilla. Trastornos de ansiedad (I). Trastorno de ansiedad generalizado. Trastorno de pánico.....	8
<b>Tabla 2-1.</b>	Enfermedades médicas que presentan síntomas de ansiedad asociados o similares.....	8
<b>Tabla 3-1.</b>	Códigos de la DSM-IV-TR y la CIE-10 de los trastornos de ansiedad. ....	11
<b>Tabla 4-1.</b>	Características de las benzodiazepinas en el ser humano.....	27
<b>Tabla 5-1.</b>	Propiedades de los receptores de aminoácidos inhibidores.....	29
<b>Tabla 6-1.</b>	Características farmacocinéticas de las Benzodiazepinas.....	33
<b>Tabla 7-1.</b>	Fármacos significativos que actúan sobre los principales subtipos de 5-HT.....	36
<b>Tabla 8-1.</b>	Dosis diaria recomendada en el tratamiento farmacológico de los trastornos de ansiedad.....	37
<b>Tabla 9-1.</b>	Tratamiento farmacológico del trastorno obsesivo-compulsivo.....	39
<b>Tabla 10-1.</b>	Tipos y características de los antidepresivos.....	39
<b>Tabla 11-1.</b>	Características farmacocinéticas de los antidepresivos.....	40
<b>Tabla 12-1.</b>	Compendio de las pruebas de mayor uso para evaluar la ansiedad en animales de experimentación.....	46
<b>Tabla 13-1.</b>	Clasificación taxonómica del Canayuyo.....	46
<b>Tabla 14-1.</b>	Clasificación taxonómica del ratón ( <i>Mus musculus</i> ).....	51
<b>Tabla 1-2.</b>	Preparación de las muestras de ensayo para el análisis de citotoxicidad.....	68
<b>Tabla 1-3.</b>	Resultados del control de Calidad Físico químico de la droga cruda desecada.....	71
<b>Tabla 2-3.</b>	Resultados del tamizaje fitoquímico en los diferentes extractos de <i>Sonchus oleraceus</i> .....	73
<b>Tabla 3-3.</b>	Desplazamientos espectrales observados en la absorción máxima para diferentes flavonas y flavonoles tratados con la adición de $AlCl_3$ y $CH_3COOK$ .....	79

<b>Tabla 4-3.</b>	Resultados de la curva de calibración de los estándares flavónicos, Apigenina, Luteolina, Quercetina; empleados para la cuantificación de flavonoides totales. UV lejano.....	79
<b>Tabla 5-3.</b>	Resultados de las absorbancias obtenidas a las longitudes de onda del pico I, para los estándares puros, apigenina, luteolina y quercetina respectivamente.....	81
<b>Tabla 6-3.</b>	Resultados de la cuantificación de flavonoides totales expresados como apigenina, luteolina y quercetina en el extracto etanólico total, el extracto hidrolizado y la muestra de ensayo. ....	81
<b>Tabla 7-3.</b>	Resultados de la cuantificación de flavonoides totales mediante HPLC, expresados como porcentaje de Apigenina, Luteolina y Quercetina.....	85
<b>Tabla 8-3.</b>	Resultados del conteo celular sanguíneo del paciente voluntario.....	85
<b>Tabla 9-3.</b>	Resultados del porcentaje de viabilidad celular calculados para las diluciones problema del extracto etanólico de Canayuyo. ....	86
<b>Tabla 10-3.</b>	Tiempo total transcurrido en los brazos abiertos. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).....	88
<b>Tabla 11-3.</b>	Número total de entradas en los brazos abiertos. Blanco (B), control positivo (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).....	88
<b>Tabla 12-3.</b>	Número total de entradas en el laberinto. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).....	88
<b>Tabla 13-3.</b>	Número total de entradas en el centro del modelo. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).....	94
<b>Tabla 14-3.</b>	Número total de entradas a la periferie del modelo. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).....	94
<b>Tabla 15-3.</b>	Tiempo total de permanencia en la zona central. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).....	94

<b>Tabla 16-3.</b>	Tiempo total de permanencia en los brazos abiertos. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).*(Administración de Flumazenil a una concentración de 1mg/kg).	100
<b>Tabla 17-3.</b>	Número total de entradas en los brazos abiertos. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).*(Administración de Flumazenil a una concentración de 1mg/kg).....	100
<b>Tabla 18-3.</b>	Tiempo total de permanencia en la zona central. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).*(Administración de Flumazenil a una concentración de 1mg/kg).....	100
<b>Tabla 19-3.</b>	Número total de entradas en el centro del modelo. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).*(Administración de Flumazenil a una concentración de 1mg/kg).....	107
<b>Tabla 20-3.</b>	Número total de entradas a la periferie del modelo. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).*(Administración de Flumazenil a una concentración de 1mg/kg).....	107
<b>Tabla 21-3.</b>	Tiempo total de permanencia en la zona central. Blanco (B), control positivo clonazepam 0,5mg/kg (CZP), concentración 1 30mg/kg (C1), concentración 2 100mg/kg (C2), concentración 3 (C3).*(Administración de Flumazenil a una concentración de 1mg/kg).....	107

## INDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Figura 1-1.</b>	Clasificación de los trastornos de ansiedad según su presentación clínica.....	10
<b>Figura 2-1.</b>	Síntomas más característicos de los ataques de pánico.....	13
<b>Figura 3-1.</b>	Modelo conceptual de la Fobia social.....	15
<b>Figura 4-1.</b>	Circuitos neuronales responsables de la respuesta ansiosa.....	20
<b>Figura 5-1.</b>	Centros nerviosos del cerebro (arriba), sistema límbico (abajo).....	22
<b>Figura 6-1.</b>	Aspectos básicos de las principales psicoterapias.....	23
<b>Figura 7-1.</b>	Efecto de las dosis crecientes de ansiolíticos (orden descendente).....	24
<b>Figura 8-1.</b>	Formulas químicas de algunos ansiolíticos y antagonistas.....	26
<b>Figura 9-2.</b>	Complejo receptor GABA-ionóforo Cl <sup>-</sup> , localización principal de los sitios de acción de los fármacos sobre el receptor GABA (Fig. izquierda) y ejemplos de xenobióticos en los diferentes espacios (Fig. derecha).....	28
<b>Figura 10-1.</b>	Esquema estructural de un receptor GABA <sub>A</sub> en donde se presenta los sitios de unión específicos para una Benzodiazepina y el aminoácido GABA.....	30
<b>Figura 11-1.</b>	Curso temporal de una BZD administrada por vía oral, que sigue un modelo bicompartimental.....	31
<b>Figura 12-1.</b>	Vías metabólicas de las principales benzodiazepinas.....	32
<b>Figura 13-1.</b>	Esquema de las vías de la 5HT en el encéfalo.....	35
<b>Figura 14-1.</b>	<i>Sonchus oleraceus</i> L. ilustración botánica.....	47
<b>Figura 15-1.</b>	Partes del canayuyo (1) flor, (2) fruto característico blanquecino y (3) hojas típicas dentadas.....	49
<b>Figura 1-2.</b>	Metodología experimental para la investigación del proyecto de titulación.....	54
<b>Figura 2-2.</b>	Proceso de elaboración del extracto etanólico de <i>Sonchus oleraceus</i> .....	55
<b>Figura 3-2.</b>	Esquema del screening fitoquímico correspondiente a los extractos etéreo, acuoso y alcohólico.....	61
<b>Figura 4-2.</b>	Análisis espectral para la identificación de Flavonoides y su cuantificación..	64
<b>Figura 5-3.</b>	Protocolo para el aislamiento de neutrófilos humanos.....	67
<b>Figura 1-3.</b>	Cromatografía en capa fina para el extracto hidroalcohólico de <i>Sonchus oleraceus</i> , visto al uv lejano.....	74

<b>Figura 2-3.</b>	Placa preparativa con fase móvil acetato de etilo: metil-isobutilcetona: ácido fórmico: agua (50:27:10:10).....	76
<b>Figura 3-3.</b>	Barridos UV de 200-400nm de los estándares apigenina (1), luteolina (2) y quercetina (3); a una concentración de 5ug/mL.....	77
<b>Figura 4-3.</b>	Barridos espectrales de 200-500 nm de los compuestos aislados mediante CCFP a partir del extracto etanólico total; (a) franja roza-anaranjado al UV, (b) franja azul-violácea al UV lejano.....	77
<b>Figura 5-3.</b>	Barridos espectrales de 200-500 nm de los compuestos aislados mediante CCFP a partir del extracto etanólico total, más la adición de reactivos de desplazamiento... ..	78
<b>Figura 6-3.</b>	Curva de calibración de los estándares de flavonoides utilizados para la cuantificación de flavonoides totales.....	80
<b>Figura 7-3.</b>	Cromatogramas HPLC (A) Estándar de apigenina (5ug/MI), (B) estándar de luteolina (5ug/MI), (C) estándar de quercetina (10ug/MI), (D) muestra etanólica hidrolizada diluida 1:10.....	83
<b>Figura 8-3.</b>	Cromatograma 3D, en donde se representa los 3 estándares apigenina, luteolina, quercetina y la muestra.....	84
<b>Figura 9-3.</b>	Regresión logarítmica de las absorbancias obtenidas en el ensayo de citotoxicidad.....	86
<b>Figura 10-3.</b>	Efecto del extracto etanólico resuspendido en polietilenglicol, obtenido de las partes aéreas de Canayuyo ( <i>Sonchus oleraceus</i> ), evaluado en el modelo EPM .....	89
<b>Figura 11-3.</b>	Efecto del extracto etanólico resuspendido en polietilenglicol, obtenido de las partes aéreas de Canayuyo ( <i>Sonchus oleraceus</i> ), evaluado en el modelo OFT .....	95
<b>Figura 12-3.</b>	Evaluación del efecto Gabaérgico del extracto etanólico resuspendido en polietilenglicol, estudiado frente a un control negativo (Flumazenil), evaluado en el modelo EPM.....	101
<b>Figura 13-3.</b>	Evaluación del efecto Gabaérgico del extracto etanólico resuspendido en polietilenglicol, estudiado frente a un control negativo (Flumazenil), evaluado en el modelo OFT.....	108

## INDICE DE ANEXOS

- Anexo A.** Espectrofotómetro Uv marac Heyios utilizado para las determinaciones de Flavonoides totales y la identificación de compuestos aislados
- Anexo B.** Equipo HPLC SCL CT0 10-A empleado para la cuantificación de Flavonoides.
- Anexo C.** Equipo de filtración por membrana empleado en la purificación de la fase móvil
- Anexo D.** Desionizador Branson 2510. (Desionización de la fase móvil)
- Anexo E.** Sistema Rotavapor para concentración de extractos
- Anexo F.** Columna en Fase sólida C-18
- Anexo G.** Separación de la fase mononuclear mediante Ficoll paque.
- Anexo H.** Sistema de pesaje de animales de experimentación
- Anexo I.** Modelo animal de laberinto en cruz elevado (EPM)
- Anexo J.** Modelo animal OFT o ensayo de campo abierto (no tese el fondo blanco característico y el número de cuadros de la periferie)

## RESUMEN

Canayuyo (*Sonchus oleraceus*) es una especie poco estudiada en el país, muy poco apreciada por ser considerada “mala hierba”, su contenido en flavonoides del tipo apigenina y luteolina (Flavonas) así como quercetina (Flavonol) es motivo de estudio para la evaluación del efecto ansiolítico. El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto citotóxico y ansiolítico del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas del Canayuyo en ratones (*Mus musculus*). El estudio se enfoca en la cuantificación de flavonoides totales por un método espectrofotométrico y Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), la evaluación de la citotoxicidad mediante el método de neutrófilos aislados y la evaluación del efecto ansiolítico y la acción Gabaérgica en ratones (*Mus musculus*) en dos modelos *in vivo*, laberinto en cruz elevado (EPM) y ensayo de campo abierto (OFT). Clonazepam fue usado como droga estándar (0,5mg/kg) y Flumazenil (1mg/kg) como agonista inverso para la evaluación de la acción de los extractos hidroetanólicos sobre los receptores GABA. Mediante HPLC se determinó 2,6792% de flavonoides totales, datos contrastables con un 2,5224% obtenido por espectrofotometría UV expresado como % de apigenina. Una concentración de 200 ppm de extracto mostró 0% de viabilidad celular. En el modelo EPM los extractos incrementan el número de entradas en los brazos abiertos ( $p < 0,05$ ) y el tiempo de permanencia en los mismos ( $p < 0,05$ ). Los extractos inducen un efecto antitímotáctico, evidenciado por un incremento de la locomoción en la parte central del modelo OFT ( $p < 0,05$ ). El extracto administrado a una concentración de 300mg/kg presenta aparentemente el mejor efecto. La actividad sobre los receptores no queda suficientemente clara, lo que se atribuye a la presencia de tres compuestos flavónicos sin actividad definida. Se recomienda realizar investigaciones posteriores con cortes a nivel del cerebro de ratones en micrótopo para evaluar el efecto a nivel de los diferentes receptores por microscopía electrónica.

**Palabras Clave:** <Canayuyo [*Sonchus oleraceus*]>, <ANSIEDAD>,<ANSIOLÍTICO>, <CROMATOLOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA [HPLC]>, <LABERINTO EN CRUZ ELEVADO [EPM]>, <ENSAYO DE CAMPO ABIERTO [OFT]>, <ÁCIDO GAMMA AMINO BUTÍRICO [GABA]>, <SISTEMA NERVIOSO CENTRAL [SNC]>



## SUMMARY

Canayuyo (*Sonchus oleraceus*) is a specie little studied in the country, little appreciated for being considered “weed”, its content of flavonoids of the type apigenina and luteolina (Flavonas) as well as quercetina (Flavonol) is motive of study for the evaluation of the anxiolytic effect. The objective of the research was to evaluate the effect cytotoxic and anxiolytic of the hydroalcoholic extract of aerial parts of Canayuyo in mice (*Mus musculus*). The study focuses on the quantification of flavonoids totals by a method spectrophotometric and liquid chromatography high efficiency (HPLC), evaluation of cytotoxicity by isolated neutrophils method and evaluation of the anxiolytic effect and action gabaergic in mice (*Mus musculus*) in two models *in vivo*, elevated plus maze (EPM) and open field test (OFT). Clonazepam was used as a standard drug (0.5 mg/Kg) and Flumazenil (1 mg/Kg) as inverse agonist for the evaluation of the action of the extracts hydroethanolics on GABA receptors. Through HPLC was determined 2.6792% of total flavonoids, data contrasted with a 2.5224% obtained by spectrophotometry UV expressed as % of apigenina. A concentration of 200 ppm of extract showed 0% of cell viability. In the EPM model extracts increased the number of entries in the open arms ( $p < 0.05$ ) and the time spent in the same ( $p < 0.05$ ). Extracts induce an effect antimotactic, evidenced by an increase of locomotion in the central part of the OFT ( $p < 0.05$ ). The activity on the receptors are not sufficiently clear, which is attributed to the presence of three flavones compounds without defined activity. It is recommended to perform subsequent investigations with cuts to level of the brain of mice in microtome to evaluate the level of different receptors by electron microscopy.

**Palabras Clave:** <Canayuyo [*Sonchus oleraceus*]>, <ANXIETY>, <ANXIOLYTIC>, <HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY [HPLC]>, <ELEVATED PLUS MAZE [EPM]>, <OPEN FIELD TEST [OFT]>, <GAMMA AMINOBUTYRIC ACID [GABA]>, <CENTRAL NERVOUS SYSTEM [SNC]>

## INTRODUCCIÓN

### Situación problemática

Hoy en día debido al desarrollo de la población, la globalización y otros aspectos hacen que el estilo de vida sea muy ajetreado, es por esto que los trastornos a nivel central como la ansiedad, en sus diferentes formas son bastante comunes y frecuentes, siendo los trastornos mentales con la mayor prevalencia, conllevando a un incremento de la morbilidad y en menor grado de la mortalidad de la población. (Jmgorman & Otros., 2000, pág. 157)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente 450 millones de personas en el mundo padecen este tipo de trastorno mental. Los factores de riesgo vinculados con la ansiedad se encuentran en el entorno, ya sea este familiar, social, educativo y laboral. Se considera que la ansiedad está vinculada a niveles de estrés significativos, principalmente relacionados con el campo laboral y el educativo en el caso de los jóvenes (Acosta, Rodríguez, & Lotero, 2008) (El Comercio, 2014)

En países europeos como España que cuentan con estudios epidemiológicos sitúan la prevalencia de la enfermedad mental, de manera general en la población, entre el 10% y el 20%, de las cuales la ansiedad es la más frecuente (Ministerio de Sanidad y Consumo (España), 2013). Tanta es la incidencia de esta patología que ciertos profesionales, psicólogos y psiquiatras, consideran a la ansiedad como la epidemia silenciosa del siglo XXI.

Son diferentes los factores que pueden incidir en la ansiedad, factores de carácter psicológico, biológico y ambiental, conllevando a producir diferentes formas de ansiedad como: ansiedad generalizada, fobias, pánico, estrés post traumático y desorden obsesivo compulsivo (Rang & Dale., Farmacología, 2008, pág. 535). En todos estos individuos siempre un tratamiento psicoterapéutico es lo adecuado, y también farmacológico. Está clara la prevalencia de tratamientos de ansiedad por medicamentos sintéticos, que deben ser administrados por vigilancia médica debido al riesgo que suponen este tipo de medicamentos como depresores del sistema nervioso central.

El principal grupo de medicamentos para el tratamiento de ansiedad lo constituyen las benzodiacepinas (BZD), de origen sintético, que presentan efectos adversos marcados tales como: somnolencia, amnesia, confusión, y trastornos en la coordinación, con un significativo deterioro de las habilidades manuales, tales como el manejo de (Rang & Dale., Farmacología, 2008, p. 535). El tratamiento prolongado con ansiolíticos conduce a un efecto conocido como rebote, en el cual los síntomas de la ansiedad adquieren mayor

intensidad, siendo necesario un ajuste de dosis, por el aumento gradual de la cantidad necesaria para producir el efecto terapéutico; esto se une a la dependencia cuya incidencia aumenta con el tiempo del tratamiento (Rang & Dale., Farmacología, 2008, p. 535). Lo mencionado anteriormente representa un gasto mayor debido a las cantidades mayores de medicamento para el tratamiento. Para el tratamiento farmacológico de este tipo de trastornos existen alternativas mediante el uso de ansiolíticos naturales como parte de los fitomedicamentos, cuyo objetivo es el mismo que el buscado con fármacos sintéticos, la ventaja de los productos naturales es el menor riesgo de efectos adversos y dependencia en terapias prolongadas o en la suspensión de las mismas. Varios estudios demuestran actualmente la efectividad de la fitoterapia tanto *in vitro* como *in vivo*. (OEM, 2009) (Cardoso, Soncini, & Giusti-Paiva, 2009, pp. 325-327)

Gran parte de los trastornos de ansiedad en nuestro medio no son identificados, y por consiguiente no reciben tratamiento adecuado. La OMS en su estudio sobre los problemas psicológicos en la atención primaria, que se llevó a cabo en 14 países, se constató una prevalencia pronunciada para el trastorno de ansiedad de tipo generalizada en el 12 % de las primeras consultas de los médicos. No obstante, a pesar de considerable morbilidad, los desórdenes de ansiedad son infradiagnosticados, lo que conduce a protocolos de tratamiento inadecuados. Los factores de carácter social pueden inducir al individuo que padece ansiedad para no acudir al médico, prefiriendo tratamientos de tipo casero como parte de la medicina tradicional, principalmente mediante la preparación de infusiones de plantas con propiedades para calmar la ansiedad.

Una de las plantas medicinales como alternativa del tratamiento de ansiedad es *Sonchus oleraceus* conocida como Canayuyo, existe experiencias de que esta planta conduce a efectos ansiolíticos, aunque no es un género tan conocido para el tratamiento de los diferentes trastornos de ansiedad, los conocimientos del medio nos permiten la realización de este estudio para medir el efecto ansiolítico que presenta esta especie. La especie *Sonchus oleraceus* es típica de la comunidad andina, frecuentemente se la encuentra en cualquier tipo de cultivo, crece en climas templados y alturas propias de la sierra ecuatoriana. El presente estudio de investigación tiene como objetivo obtener el extracto hidroalcohólico de flor de canayuyo (*Sonchus oleraceus*) por maceración, evaluando la actividad contrarrestante de la ansiedad a diferentes concentraciones de extractos en ratones (*Mus musculus*) mediante ensayos estandarizados para evaluar el comportamiento del Sistema Nervioso Central como son: Test de Cruz Elevado y Test de Campo abierto.

# CAPITULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación

La investigación científica como parte de los proyectos de titulación de pregrado constituyen un soporte fundamental para el desarrollo profesional de todos los estudiantes universitarios, cada uno de estos temas de investigación tiene un fin, sea contribuir a una sociedad solucionando alguna problemática o en el caso propio de un Bioquímico mejorando la calidad de vida de los ciudadanos.

La investigación propuesta en estudio sigue una metodología exploratoria o experimental, ya que se investiga en una rama de la ciencia en la cual existe poca información sobre las cantidades de flavonoides, la toxicidad general y el efecto ansiolítico de la planta comúnmente conocida como Canayuyo cuyo nombre científico es *Sonchus oleraceus*. La metodología seguida principalmente para el estudio ansiolítico es experimental pura, debido al manejo total sobre las variables dependientes.

Todos los resultados de este estudio tienen como finalidad contribuir a brindar una alternativa para el manejo de la ansiedad a los ciudadanos ecuatorianos, aportando una nueva fuente de tratamiento a las ya existentes en el mercado como parte de los productos de venta libre.

### 1.2. Antecedentes de la Investigación

El término ansiedad nace en el siglo XVIII, por obra del fisiólogo Escocés William Collen, para poder describir una afección o aflicción del sistema nervioso y discriminarla de la llamada neurosis ansiosa, con el cual era frecuentemente confundido, que tiempo después fuese denominada alteración por ansiedad. (Cordoba, et. al, 2005, pp. 7-10)

Los datos epidemiológicos demuestran la importancia de conocer el problema de la ansiedad. De acuerdo con Myrna Weissman, la frecuencia de éste trastorno es entre 4% y 8% al año. Demostrando así mismo que la probabilidad de sufrir la enfermedad durante la vida es del 15% y que es más común en las mujeres, jóvenes y en personas con poca educación. (Cordoba, et. al, 2005, pp. 7-10)

En 1998 en el estudio “la ansiedad” de Rojas, Aarón Beck, sugiere que este desequilibrio psicológico se ve influenciado principalmente por una vulnerabilidad que nace de la predisposición del individuo a disminuir su capacidad para resolver los problemas, percibiendo de sobremanera las situaciones amenazantes que provocan ansiedad contra las relaciones sociales, la libertad y la identidad propia. Años después concepto de ansiedad cambia, por ejemplo el propuesto por Dour el cual es recopilado en el estudio “Modelos animales para el estudio de ansiedad: una aproximación crítica” definiendo a la ansiedad como un estado de malestar caracterizado por intranquilidad, expectación aprehensiva y aumento de la vigilancia en ausencia de un estímulo desencadenante.

Con frecuencia se manifiestan también reacciones autonómicas, como sudoración, taquicardia, alteraciones gastrointestinales, tensión muscular, temblor e insomnio, entre otras (Gómez, Saldivar-González, & Rodríguez, 2002, pp. 1-10). En el mismo estudio se indica que el Inventario de Enfermedades Psiquiátricas, editado por la Asociación Norteamericana de Psiquiatría: el DSM IV, indica, además, que la sintomatología deberá persistir durante por lo menos seis meses, aunque algunos individuos consideren que han padecido de ansiedad durante toda su vida (Gómez, Saldivar-González, & Rodríguez, 2002, pp. 1-10). En la actualidad se puede encontrar definiciones más específicas, Flórez en su libro “Farmacología Humana” define a la ansiedad como una emoción normal y un trastorno psiquiátrico, dependiendo de su intensidad y de su repercusión sobre la actividad de la persona. Además se propone que en condiciones normales la ansiedad constituye uno de los impulsos naturales que motiva al individuo a realizar sus funciones y a enfrentarse a situaciones nuevas. (Flórez, 2014, pp. 543-565)

Está claro que con la evolución de las ciencias de la salud el estudio de la ansiedad ha crecido significativamente, hoy en día se puede definir varias clasificaciones de la ansiedad, para el propósito de la elaboración de esta investigación se considera la expuesta por Rang & Dale, en su libro “Farmacología”, en la cual se establece que la ansiedad según su presentación clínica se clasifica en: Trastorno de ansiedad generalizada (un estado constante de ansiedad excesiva, sin ninguna razón u origen claro); trastorno de ansiedad social (miedo a estar con otras personas a relacionarse con ellas); trastorno de angustia (ataques súbitos de miedo irresistible asociados a marcados síntomas somáticos como sudoración, taquicardia, dolores torácicos, temblor y sensación de ahogo). Tales ataques pueden inducirse con infusión de lactato de sodio, incluso en individuos normales; el trastorno parece tener un componente genético; fobias (miedo intenso a situaciones u objetos específicos Trastorno de estrés postraumático (ansiedad desencadenada por el recuerdo de experiencias estresantes ocurridas en el pasado); Trastorno obsesivo compulsivo (conducta compulsiva de tipo ritual dirigida por una ansiedad irracional) (Rang & Dale., Farmacología, 2012, pp. 531-539).

En 2008, Festorazzi, Rodríguez & Lotero, en su estudio “Epidemiología de los trastornos de ansiedad y depresión en adolescentes de una población rural” realizado en una población rural de Argentina determinan que los pacientes que no presentaron ningún tipo ansiedad representan el 59% de los encuestados, los casos leves de ansiedad representan el 30%, mientras que los casos moderados y graves representan un 11% del total. (Festorazzi, Rodríguez, & Lotero, 2008, pp. 5-8)

En el estudio “Estudio clínico y epidemiológico de la ansiedad y la depresión en una muestra de 1159 pacientes”, realizado en el año 2010 en la ciudad de Caracas por Marsiglia en una muestra de 1159 pacientes con ansiedad y depresión en el cual se analizó las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes de la consulta de medicina interna del área metropolitana de Caracas, en dicho estudio se determinó que los trastornos de ansiedad estuvieron presentes en 160 casos, presentando una prevalencia del 13,8 %. La relación hembra: varón fue 2,4: 1 y la edad ( $X \pm 1DS$ )  $46,77 \pm 16,25$  años, sin mostrar diferencia con el promedio de edad de la muestra, en cuanto a su relación con la ansiedad el promedio de edad es 7,3 años menor que en los casos de depresión. El 16,15 % de los casos de ansiedad fueron ancianos, porcentaje significativamente menor al de los ancianos de la muestra (28,30 %). En un 63,75% se diagnosticó desorden de ansiedad generalizada, siendo esta la principal manifestación de ansiedad, en el 36,25 % de los casos, la ansiedad se presenta como una manifestación psiquiátrica primaria, especialmente, desorden afectivo primario y desorden de pánico. (Marsiglia, 2010, pp. 10-12)

Datos recientes en el año 2013 en el estudio “Prevalencia de trastornos mentales y factores asociados en pacientes de atención primaria mayores de 75 años”, en el cual se destaca que el 47.4% de la muestra presenta uno o más trastornos psiquiátricos, siendo los más prevalentes los trastornos del estado de ánimo (33.8%), seguidos por los somatomorfos (24.4%) y los de ansiedad (14.3). (Vives, et al., 2013, pp. 218-226)

En los últimos años los fitofármacos como aplicación de las hierbas medicinales se utilizan popularmente en todo el mundo y podría ser una opción para el tratamiento de la ansiedad si se demuestra que es eficaz y segura. *Sonchus oleraceus* L. (Compositae) es una hierba anual, originaria de Europa, Norte de África y Asia, crece y se reproduce a través de una diversa variedad de hábitats. *Sonchus oleraceus* constituye la dieta tradicional de los Māori; también se ha utilizado en las prácticas médicas tradicionales de las islas de Hawai para el tratamiento de una amplia variedad de trastornos tanto a través de la aplicación externa e interna (Mawalagedera, 2014, pp. 1-2).

*Sonchus oleraceus* L. se ha utilizado como un tónico popular en la medicina alternativa de la población brasileña, no obstante, se dispone de poca información científica con respecto a esta especie; Cardoso, Soncini & Giusti en el año 2009 mencionan que no existen informes relacionados con su posible efecto sobre el sistema nervioso central. (Cardoso, Soncini, & Giusti-Paiva, 2009, pp. 325-327)

Existen pocos estudios acerca de la actividad ansiolítica de *Sonchus oleraceus*, la principal referencia en cuanto a esta actividad es el estudio “Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice” elaborado por Cardoso, Soncini & Giusti, en el cual su estudio evaluó el efecto de los extractos diclorometánico e hidroetanólico de *Sonchus oleraceus* en ratones sometidos a los ensayos de laberinto elevado y las pruebas de campo abierto, en un diseño experimental en el cual el Clonazepam es utilizado como el medicamento de referencia; los resultados demuestran que ambos extractos tienen un efecto ansiolítico en algunas de las dosis ensayadas en estos dos modelos murinos de ansiedad. (Cardoso, Soncini, & Giusti-Paiva, 2009, pp. 325-327)

### **1.3. Bases teóricas**

#### **1.3.1. Ansiedad**

El término ansiedad proviene del latín “anxietas”, angustia o aflicción; la ansiedad es una emoción humana y universal, que se encuentra estrechamente relacionada al miedo y que en muchas situaciones tiene como finalidad la adaptación al entorno, desde el punto de vista psicobiológico (Gilman & Goodman., 2011, pp. 397-415). La ansiedad como condición normal suele estar relacionada con diferentes experiencias de descubrimiento, novedad, muchas de ellas dependientes del desarrollo normal del individuo a lo largo de su vida.

En la actualidad la ansiedad es una de los problemas y afecciones más comunes entre humanos, y la mayoría de personas lo sufrimos o nos vemos afectados por dicha condición en alguna época de la vida. Los trastornos de ansiedad constituyen las enfermedades psiquiátricas más frecuentes en el entorno socio-cultural y representan aquellas afecciones más atendidas por médicos generales. (Gilman & Goodman., 2011, pp. 397-415) (Ferre & Camarillo, 2013, pp. 2747-2754)

Como una manera de respuesta normal ante el temor y otros estímulos que suponen una condición de amenaza, la ansiedad tiene diversos componentes; entre los más importantes se

puede mencionar los reflejos autónomos, comportamientos defensivos y pesimistas, estado de alerta, emociones negativas y secreción de glucocorticoides (Ferre & Camarillo, 2013, pp. 2747-2754). En términos patológicos, la ansiedad puede describirse como la vivencia de un sentimiento de amenaza, expectación de carácter tenso ante el futuro inmediato y de alteración del equilibrio psicosomático ante acciones que no representan un peligro real o, por lo menos, desproporcionada en relación con el estímulo desencadenante. (Flórez, 2014, pp. 543-565)

El límite entre el estado de ansiedad en el cual se diferencia de un estado normal a un estado patológico diagnosticable es difícil de establecer y aún no está claro, pero podría establecerse en el nivel en el cual este trastorno interfiere con las actividades cotidianas, en el nivel en el cual en lugar de favorecer la el comportamiento interfiere con él, alcanzando un cierto protagonismo en el cual el individuo plantea toda su atención sobre dicho estado. (Ferre & Camarillo, 2013, pp. 2747-2754) (Flórez, 2014, pp. 543-565).

Actualmente existe una preocupación en la sociedad debido a las enfermedades secundarias a la ansiedad, ya que los criterios clínicos más relevantes en la actualidad manejan la teoría de que toda enfermedad tiene una base o «punto de partida» psicológico, que puede comprender un trastorno de ansiedad o estrés, o incluso muchas patologías manifiestan relaciones asociadas a la ansiedad (véase tabla 2-1). La epidemiología abarca 1 de cada 5 personas, aproximadamente un 18 %, que visitará al médico a lo largo de un año debido algún trastorno de ansiedad (Ferre & Camarillo, 2013, pp. 2747-2754).

### **1.3.1.1. Manifestaciones clínicas**

Los síntomas de la ansiedad se pueden definir en tres tipos; físicos, cognitivos y psicológicos. (Tabla 1-1) Los síntomas físicos van a expresarse en función de la regulación de catecolaminas, los niveles de cortisol (un aumento sobre los niveles normales) y la alteración asociada al sistema inmune (Escamilla, 2011, pp. 5725-5733). Estas manifestaciones físicas pueden ser agudas, y a mediano o largo plazo, en donde pueden manifestarse condiciones patológicas crónicas como hipertensión y enfermedades cardiovasculares. Dentro de las manifestaciones psicológicas la ansiedad, mediante sus manifestaciones fisiológicas (taquicardia, palpitaciones, etc.) puede aumentar el miedo y el estado de activación o alerta.

La ansiedad afecta al pensamiento, el aprendizaje y la percepción (Escamilla, 2011, pp. 5725-5733). Es así que la condición ansiosa frecuentemente tiende a manifestar ciertas distorsiones en la percepción en tiempo y espacio, respecto a hechos e individuos. Dichas distorsiones pueden tener efecto sobre el aprendizaje y la atención. Dentro del tratamiento, un posible estado de “bloqueo” cognitivo puede dificultar la colaboración del sujeto a la terapia.



**Tabla 1-1.** Síntomas de los trastornos de ansiedad. Tomada de Escamilla. Trastornos de ansiedad (I). Trastorno de ansiedad generalizado. Trastorno de pánico.

<b>Psicológicos</b>	Miedos anticipatorios, estado de hipervigilancia (irritabilidad, sensibilidad al ruido) dificultad para concentrarse en su actividad diaria, inquietud, preocupaciones excesivas (en algunos casos obsesiones), ánimo bajo
<b>Físicos</b>	
Gastrointestinales	Sequedad de boca, disfagia, molestias epigástricas, meteorismo, alteración de ritmo intestinal
Respiratorios	Opresión centrotorácica, dificultad para la inspiración, hiperventilación
Cardiovasculares	Palpitaciones, dolor precordial
Genitourinarios	Disuria, urgencia miccional, disfunción eréctil, dismenorrea, amenorrea
Sistema neuromuscular	Temblor, parestesias, tinnitus, mareo, cefalea, mialgias
Alteraciones del sueño	Insomnio, terrores nocturnos
<b>De conducta</b>	Rituales, conducta de evitación
<b>Cognoscitivos</b>	Despersonalización, desrealización Hiperfocalización, dificultad en la elaboración de estrategias de enfrentamiento y análisis de causas

Fuente: (Escamilla, 2011)

**Tabla 2-1.** Enfermedades médicas que presentan síntomas de ansiedad asociados o similares.

<b>Trastornos neurológicos</b>	<b>Estados deficitarios</b>
Neoplasias cerebrales	Deficiencia de vitamina B12
Traumatismo cerebral y síndromes postconfusionales	Pelagra
<b>Enfermedades cerebrovasculares</b>	<b>Patologías diversas</b>
Hemorragias subaracnoideas	Hipoglucemia
Migraña	Síndrome carcinoide. Neoplasias malignas
Encefalitis	Síndrome premenstrual
Sífilis cerebral	Enfermedades febriles e infecciones crónicas
Esclerosis múltiple	Porfiria
Enfermedad de Wilson	Mononucleosis infecciosa
Enfermedad de Huntington	Síndrome posthepático
Epilepsia	Uremia
<b>Patologías sistémicas</b>	<b>Abstinencia de alcohol y de otras sustancias</b>
Hipoxia	Tóxicas
<b>Enfermedades cardiovasculares</b>	Cafeína y abstinencia de cafeína
Arritmias cardíacas	Anfetaminas
Insuficiencia pulmonar	Sulfonamidas
Anemia	Cannabis
<b>Alteraciones endocrinas</b>	Mercurio
Disfunción pituitaria	Arsénico
Disfunción tiroidea	Fósforo
Disfunción paratiroidea	Organofosforados
Disfunción suprarrenal	Disulfuro de carbono

Fuente: (Escamilla, 2011)

### **1.3.1.2. Causas de los trastornos de ansiedad**

La ansiedad como se mencionó anteriormente puede ser una condición normal de respuesta, pero cuando se pasa este umbral y se vuelve una patología el personal de salud, principalmente médicos especialistas y psicólogos necesitan conocer las causas de las cuales deriva la condición ansiosa, de tal manera se pueden citar ciertas causas que involucran una predisposición a un trastorno de ansiedad:

- ✓ Estilo de vida (condiciones de presión laboral, jornadas de trabajo extensas, sedentarismo, etc.)
- ✓ Falta de sueño (dormir menos de 7 horas con calidad de sueño)
- ✓ Alimentación (nutrición inconsistente, comidas a destiempo)
- ✓ Vicios (alcohol, tabaco)
- ✓ Factores fisiológicos (enfermedad que afecten el estilo de vida)
- ✓ Predisposición conductual (mal manejo ante condiciones de riesgo, malestar autónomo)
- ✓ Factores sociales (rechazo, acoso)

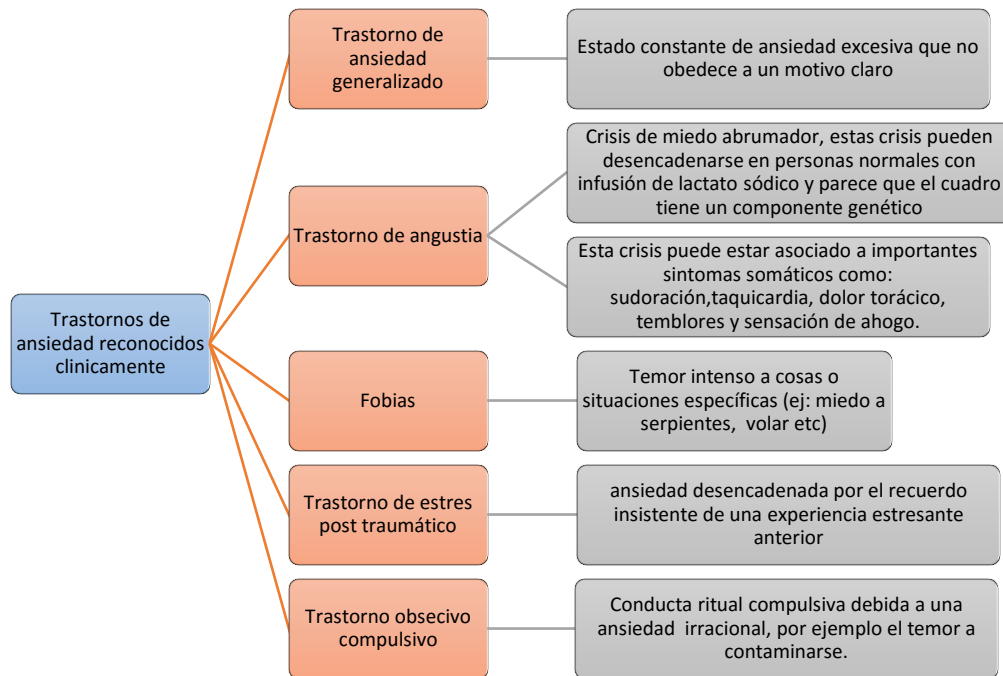
Además de lo antes mencionado es importante señalar que la ansiedad puede obedecer a varias causas y no solo una, actuando de una manera multicondicional, en la cual la ansiedad puede ser resultado de la suma de los efectos producidos por individual de cada condición, también existen casos en los cuales el paciente puede ser diagnosticado con un trastorno mixto, debido a signos y síntomas no tan específicos; y además la ansiedad se encuentra vinculada en muchas ocasiones con la depresión, y esta última principalmente puede presentarse en los trastornos más graves de ansiedad o en aquellos en los cuales el control es difícil por causas diversas.

### **1.3.2. Tipos de ansiedad**

El término «ansiedad» es comúnmente aplicado a varios trastornos de naturaleza distinta, los cuales tienen diferentes expresiones en el ser humano, así también sugieren diferentes diagnósticos, existe así una división básica que facilita la explicación de por qué diferentes tipos de ansiedad responden de manera distinta a fármacos distintos en los diferentes tratamientos, es aquella que discrimina entre:

- 1) Trastornos que suponen o implican miedo (fobias y crisis de angustia)
- 2) Trastornos que implican una expresión de ansiedad más generalizada (generalmente clasificados como trastornos de ansiedad generalizada)

En función de su expresión clínica, los trastornos de ansiedad pueden clasificarse en seis grupos principalmente (fig. 1-1)



**Figura 1-1.** Clasificación de los trastornos de ansiedad según su presentación clínica.

**Fuente:** (Rang & Dale., Farmacología, 2012)

**Elaborado por:** (Orma, 2015)

Actualmente la DSM IV-Tr y la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE10), presentan una distinción entre los diferentes tipos de TA (véase tabla 3-1). La DSM IV-Tr a diferencia de la CIE 10 distingue entre trastorno de pánico (TP) con y sin agorafobia

**Tabla 3-1.** Códigos de la DSM-IV-TR y la CIE-10 de los trastornos de ansiedad.

Trastorno	DSM-IV-TR	CIE-10
Trastorno de ansiedad generalizada	300.2	41.1
Trastorno de pánico sin agorafobia	300.01	41.0
Trastorno de pánico con agorafobia	300.21	41.0
Agorafobia sin trastorno de pánico	300.22	40.0
Fobia social	300.23	40.1
Fobia específica	300.29	40.2
Trastorno obsesivo compulsivo	300.3	42

CIE: Clasificación Internacional de Enfermedades; DSH: Clasificación de Enfermedades Mentales.  
Modificada de Schlatter J<sup>15</sup>.

Fuente: (Escamilla, 2011)

### 1.3.2.1. Trastornos de ansiedad generalizada

El trastorno de ansiedad generalizada (TAG) es bastante común entre las personas, comúnmente los individuos que padecen de esta condición suelen estar siempre tensos y con preocupaciones excesivas, a pesar de que no exista razones suficientemente importantes que justifiquen esta condición. La intensidad de esta condición determina la afección sobre la toma de decisiones y la interferencia sobre las acciones cotidianas (Ferre & Camarillo, 2013, pp. 2747-2754)

Las afecciones físicas comprenden:

- ✓ dificultad para concentrarse
- ✓ dificultad para relajarse
- ✓ dificultad en la adherencia al sueño nocturno.

Todas estas condiciones tienden a predisponer al individuo a presencia de fatiga, cefaleas, contracturas y tensión muscular elevada, así como múltiples síntomas inespecíficos a nivel digestivo, respiratorio o cardíaco.

Los especialistas consideran que para poder detectar un trastorno de ansiedad generalizada es preciso que el paciente manifieste este tipo de sintomatología durante seis meses o más (Ferre & Camarillo, 2013, págs. 2747-2754)

### 1.3.2.1.1. Epidemiología y evolución

La frecuencia de este trastorno estará en dependencia del criterio diagnóstico empleado, pero se estima aproximadamente que a lo largo de la vida la prevalencia es de un 5% y dentro de este porcentaje se encuentra preferentemente antes de los 25 años de edad aunque pueden darse crisis incluso en edades avanzadas; y afecta al doble de las mujeres que a los hombres (Escamilla, 2011, pp. 5725-5733).

### 1.3.2.2. Trastorno de angustia y crisis de pánico

El trastorno de angustia se caracteriza por la expresión de crisis de pánico, en el que generalmente se manifiesta un miedo intenso acompañado de síntomas físicos entre los cuales destacan:

- Temblor
- Palpitaciones
- Falta de aire
- Sudoración
- Piloerección
- Y en ciertas ocasiones pérdida del conocimiento (véase también figura 2-1)

Además la crisis de angustia puede llegar a producir una sensación de irrealidad del entorno o medio externo, a lo que se le denomina «desrealización», que puede estar acompañado de un miedo intenso al descontrol, pudiendo representar un miedo de no ser uno mismo «despersonalización» (Ferre & Camarillo, 2013, pp. 2747-2754) (Pelissolo, 2012, pp. 1-10)

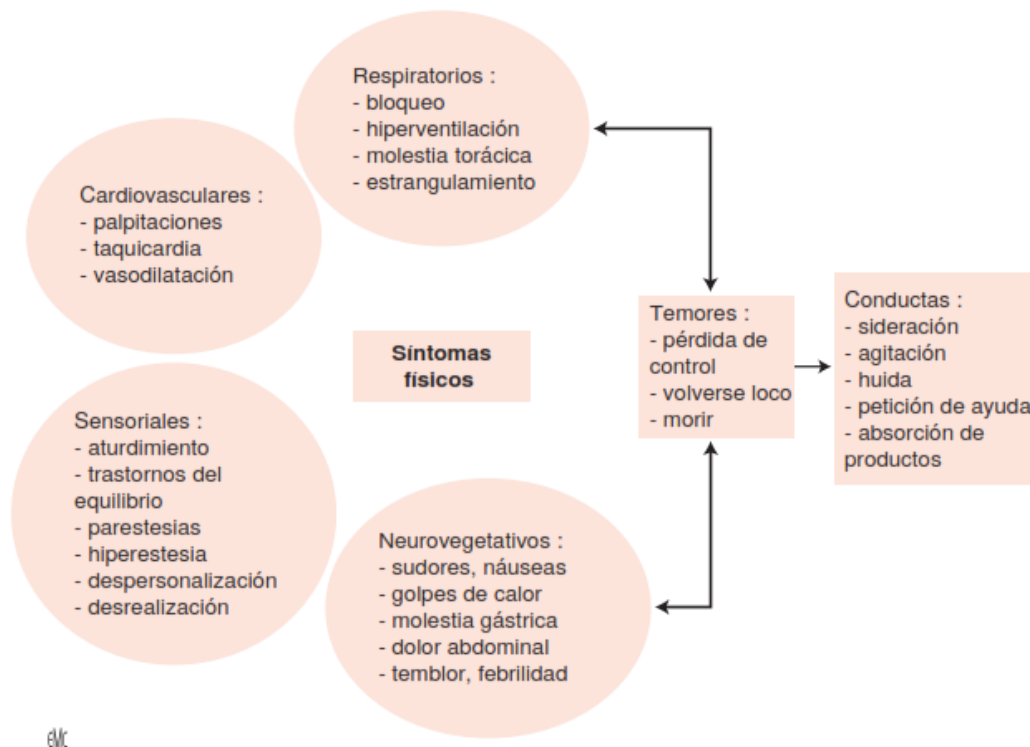
Aunque la crisis de pánico suele durar en término medio 10 minutos, algunos síntomas pueden extenderse durante mucho más tiempo (Ferre & Camarillo, 2013, pp. 2747-2754). Pelissolo señala que tales crisis llegan a su clímax a los 10 minutos y que puede durar en promedio de 15-30. (Pelissolo, 2012, pp. 1-10)

En algunas situaciones específicas las crisis pueden desencadenarse con mayor facilidad, estas situaciones comprenden principalmente:

- ✓ Soledad
- ✓ Conglomeración
- ✓ Apremio por multitudes
- ✓ Lugares cerrados (grandes espacios, tiendas grandes, ascensor)

- ✓ Lugares abiertos con temor a perder el punto de referencia (bosques, plazas grandes)
- ✓ Medios de transporte que pueden inducir claustro (metro, aviones)

El paciente por naturaleza evita los lugares o situaciones que voluntaria o involuntariamente relaciona con las crisis de angustia. En este caso específico se habla de crisis de angustia con agorafobia (temor a todas las cosas de las cuales no se puede huir fácilmente en caso de ataque de pánico). El tratamiento del trastorno de angustia es continuo y tiene como finalidad la abolición de la crisis de pánico, así como prevenir posibles recaídas (Ferre & Camarillo, 2013, pp. 2747-2754).



**Figura 2-1.** Síntomas más característicos de los ataques de pánico  
**Fuente:** (Pelissolo, 2012)

### 1.3.2.2.1. Epidemiología y evolución

En el año 2011 Escamilla refiere que “La prevalencia en un año del TP es de un 2,3% en la población general (1,7% en varones frente a un 3% de mujeres) y de un 3,8% a lo largo de la vida”. En Atención Primaria las cifras varían entre un 3 y un 8%. (Escamilla, 2011, pp. 5725-5733).

Pelissolo establece que “El trastorno de pánico, con o sin agorafobia, afecta a alrededor del 2-3% de la población en algún momento de la vida. Afecta de dos a tres veces más a las mujeres que a los varones. El promedio de edad de aparición se sitúa entre los 20 y los 30 años.” (Pelissolo, 2012, pp. 1-10). A lo largo de la vida este trastorno puede sufrir periodos de remisión y

agravamiento, pudiendo evolucionar incluso por más de 20 años, las principales complicaciones para este trastorno además de la discapacidad funcional y del sufrimiento cotidiano, constituyen episodios depresivos y abuso de sustancias como el alcohol y medicamentos que en primera instancia pueden utilizarse como ansiolíticos y que pueden desencadenarse en dependencias, tanto físicas como psicológicas. (Pelissolo, 2012, pp. 6-10)

### **1.3.2.3. Fobias**

Las fobias frecuentemente fueron deslindadas de un trastorno de ansiedad, es así que durante mucho tiempo fueron ignoradas a pesar de que pueden producir discapacidades significativas.

Las fobias pueden ser definidas como una variante de la ansiedad, o el malestar repetitivo, poco lógico y desproporcionado ante estímulos determinados (Schalatter & Gamazo., 2011, pp. 5734-5741).

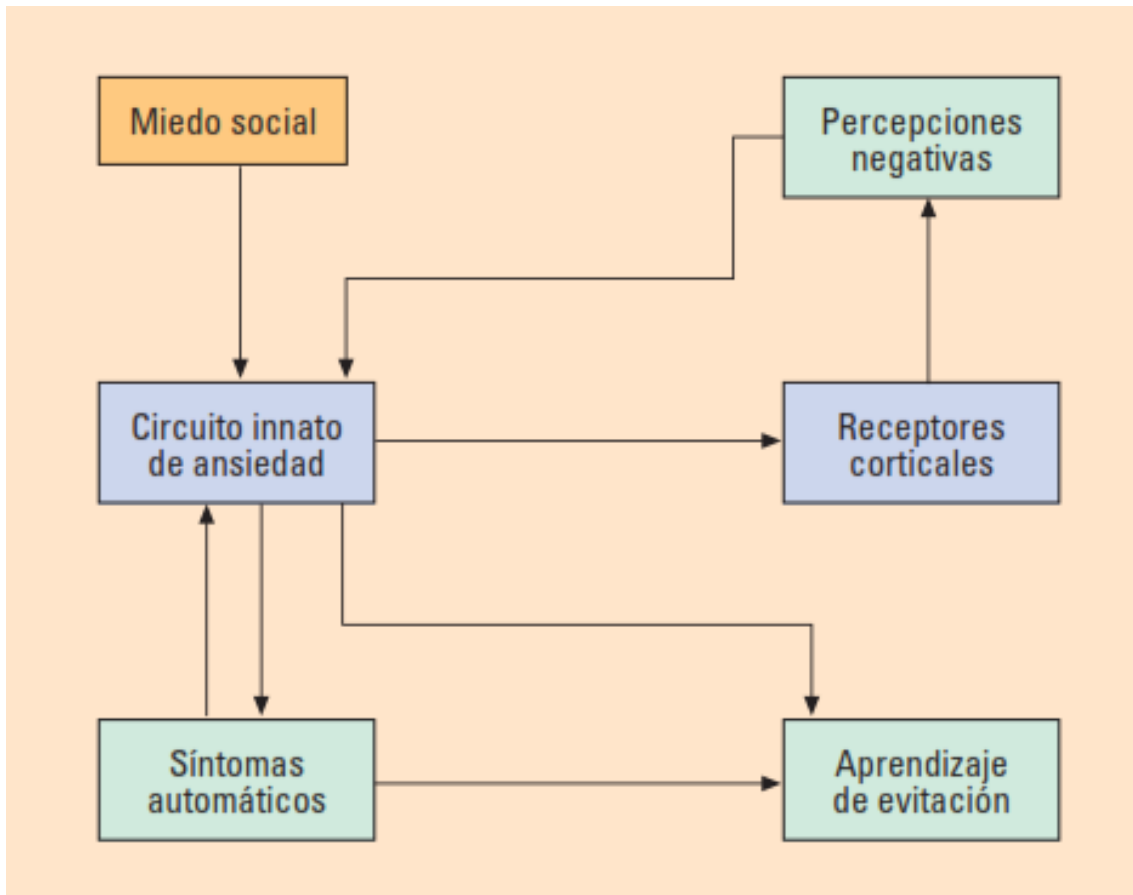
Las fobias pueden clasificarse en tres tipos principales:

- 1) Fobia social
- 2) Fobias específicas.
- 3) Agorafobia

#### **1.3.2.3.1. Fobia social**

En esta variante de trastorno por Fobia el estímulo consiste de una situación social que el individuo percibe como embarazosa y representan algún tipo de impedimento conductual (fig. 3-1). Los individuos que padecen de fobia social sienten un miedo intenso, crónico y persistente a ser vistas y juzgadas por la sociedad que los frecuenta o a realizar tareas en las cuales no se sienten cómodos o por lo menos no totalmente delante de otras personas (hablar en público, expresarse ante un grupo, opinar, etc.) El *National Comorbidity Study* sitúa a este tipo de fobia como la segunda causa de trastorno mental más frecuente en EE. UU.

Dentro de la fobia social se pueden distinguir dos variantes: fobia social generalizada y fobia social específica. Los estudios epidemiológicos más recientes demuestran que cerca del 7% de la población presentan fobia social (Ferre & Camarillo, 2013, pp. 2747-2754). Otros estudios señalan una prevalencia de vida con un rango entre 7 a 13%, con una prevalencia anual de 2.3%. Datos importantes acerca de la comorbilidad de la fobia social indican una relación de hasta un 80% con los pacientes que padecen esta condición (Schalatter & Gamazo., 2011, pp. 5734-5741).



**Figura 3-1.** Modelo conceptual de la Fobia social.

Fuente: (Schalatter & Gamazo., 2011)

### 1.3.2.3.2. Fobia Específica

La fobia específica está caracterizada por un miedo intenso e irracional hacia un estímulo concreto; el miedo a este estímulo genera acciones y esfuerzos para tratar en lo posible mantenerse lejos del objeto que causa este miedo. En este tipo de fobia se encuentran involucrados el hipocampo y la amígdala. (Schalatter & Gamazo., 2011, pp. 5734-5741).

Entre las situaciones más comunes que desencadenan la fobia específica se encuentran:

- ✓ Miedo a ciertos animales (principalmente arañas e insectos)
- ✓ Miedo a lugares cerrados o concurridos
- ✓ Transporte (miedo a viajar en avión, etc.)
- ✓ Miedo a las alturas
- ✓ Miedo a ensuciarse
- ✓ Miedo a la sangre (carácter hereditario), entre otros.

Pese a que la concurrencia de esta enfermedad es significativa es poco frecuente que se busque asistencia médica para su tratamiento, debido a que en la mayoría de los casos este trastorno puede evitarse o solucionarse evitando el objeto o estímulo temido.



La fobia específica es considerada el trastorno de ansiedad más frecuente y representa aproximadamente una incidencia anual del 8.6% (Ferre & Camarillo, 2013, pp. 2747-2754). La prevalencia de vida en Estados Unidos es del 12.5%, mientras que en Europa representa el 7.7%. La prevalencia es casi el doble en mujeres que en varones, varios estudios demuestran que en varones prevalece las fobias situacionales y en mujeres las fobias a los animales. (Schalatter & Gamazo., 2011, pp. 5734-5741).

Datos de comorbilidad demuestran que el 1/3 de pacientes con fobia específica presentan crisis depresivas y el 42% padecen otros cuadros de ansiedad simultáneamente (Schalatter & Gamazo., 2011, pp. 5734-5741).

#### **1.3.2.3.3. Agorafobia**

La agorafobia se define como el miedo irracional y desmedido a condiciones en las que un individuo teme acusar una crisis de pánico, perder el control o morir, a la misma vez que se denota cierta dificultad para escapar de esta situación. Freud años atrás relacionó la agorafobia con las crisis de pánico, suscitando una controversia aún sin resolución; como se mencionó antes la DSM IV-Tr a diferencia de la CIE 10 distingue entre trastorno de pánico (TP) con y sin agorafobia, pero no lo consideran así otros autores. (Schalatter & Gamazo., 2011, pp. 5734-5741).

La prevalencia en Estados Unidos se encuentra en el rango de 0.6-6%, mientras en España es del 0.3% anual, y el porcentaje de prevalencia a lo largo de la vida es de 0.62%. Las mujeres padecen más este trastorno y con frecuencia con mayor gravedad y mayor comorbilidad. (Schalatter & Gamazo., 2011, pp. 5734-5741).

#### **1.3.2.4. Trastorno de estrés post-traumático**

El trastorno de estrés postraumático o estado de estrés postraumático (EEPT) se trata de una condición crónica, que generalmente se manifiesta después de un episodio traumático y violento, que implica una que atente contra la vida (amenaza letal) o una amenaza para la integridad física del individuo; se pueden citar: atentados, intentos suicidas, intentos de asesinato, violaciones, catástrofes naturales, etc. El paciente puede estar involucrado directamente o haber presenciado el acto traumático, como la muerte de un ser querido (Pelissolo, 2012, pp. 1-10).

La reacción inmediata del paciente ante tal vivencia puede referir un terror intenso en primer lugar, seguido de una Sideración moderada en el tiempo (despersonalización, postración), después de la cual le sigue una mejoría progresiva y por último una «fase de latencia» en la cual se da una mejoría hasta la condición normal del paciente.

En la presentación clínica de tal trastorno después de algunas semanas, meses o hasta años el paciente puede referir ciertos síntomas en particular:

- ✓ Síndrome de repetición por revivencias del trauma (pesadillas, impresiones de muerte inminentes, flash-backs diurnos)
- ✓ Síntomas de ansiedad (ansiedad generalizada, restricciones, fobias específicas a partir del trauma)
- ✓ Síntomas depresivos, pesimismo e incluso ideas suicidas

Las complicaciones de comorbilidad de los EEPT son los trastornos depresivos y adicciones a ciertas sustancias como el alcohol y medicamentos tipo BZD (Pelissolo, 2012, pp. 1-10).

#### **1.3.2.5. Trastorno obsesivo compulsivo**

El trastorno obsesivo compulsivo (TOC) se encuentra caracterizada por pensamientos intrusivos y recurrentes (obsesiones) que generalmente se ven acompañados por conductas de carácter repetitivo que aparentemente no muestran un propósito definido (compulsiones) (Pelissolo, 2012, pp. 1-10) (Schalatter & Gamazo., 2011, pp. 5734-5741).

Las obsesiones pueden abarcan pensamientos, imágenes e ideas involuntarias y repetitivas que afectan en diferente grado la actividad mental, el individuo las percibe como inadecuadas y sin sentido, además son causantes de malestar significativo. El sujeto es consciente de que los factores mencionados anteriormente son fruto de su mente, los reconoce como propios aunque involuntarios, llegando a sentir una incapacidad para librarse de los mismos (Schalatter & Gamazo., 2011, p. 5737).

Las obsesiones pueden derivar de varios temas:

- ✓ Duda y errores
- ✓ Miedos
- ✓ Contaminación y suciedad
- ✓ Orden y la colocación
- ✓ Recuerdos
- ✓ Sexualidad y agresividad, etc.

Los temas alrededor de la obsesión más frecuentes son los de duda y contaminación (Schalatter & Gamazo., 2011).

Las compulsiones por otro lado pretenden evitar o producir un acontecimiento en específico, produciendo así una disminución de la ansiedad, estrés, malestar y tensión provocada por la manifestación de ideas compulsivas; en cambio ocurre todo lo contrario cuando el sujeto intenta

de alguna manera oponerse a su realización. Al igual que las obsesiones, las compulsiones son percibidas por el individuo como irracionales, y como mecanismo de acción normal se suele tender a ocultarlas (Schalatter & Gamazo., 2011, p. 5738).

Las compulsiones más comunes constituyen:

- Lavado de manos
- Necesidad de comprobación
- Preguntar
- Contar
- Necesidad de simetría

#### **1.3.2.5.1. Epidemiología y evolución**

Datos epidemiológicos plantean la prevalencia de este tipo de ansiedad en la población occidental alrededor del 2.5%, aunque se sugiere que son datos muy variables debido al método de valoración y a que frecuentemente el individuo tiende a ocultar su condición. La mitad de los casos tienen su inicio en los primeros años de vida, principalmente al final de la infancia y en la adolescencia temprana, con un inicio más apresurado en varones que en mujeres que tiende a evolucionar durante períodos largos. Otros datos epidemiológicos plantean una prevalencia de un 2-3% de los individuos (Pelissolo, 2012, pp. 2) (Schalatter & Gamazo., 2011, pp. 5738).

#### **1.3.3. *Mecanismos neuropsicofisiológicos***

Existen varios modelos que tratan de explicar el origen y el establecimiento de las alteraciones afectivas que definen la ansiedad, así como la organización de los mecanismos neurofisiológicos mediante los cuales se presentan manifestaciones vegetativas, conductuales y somáticas. (Flórez, 2014, pp. 543-565)

Hurlé, Monti y Flórez en 2014 establecen “La ansiedad y el miedo conforman respuestas de adaptación a la amenaza y al estrés. Ambos surgen en respuesta a estímulos exteroceptivos visuales, auditivos u olfatorios, a estímulos somato-sensoriales o a la influencia interoceptiva que proviene de las vísceras, del sistema endocrino y del sistema vegetativo.” Además de esto la ansiedad puede ser resultado de ciertos procesos cognitivos capaces de anticipar, recordar o interpretar hechos que son percibidos como estresantes, traumáticos o amenazantes. (Flórez, 2014, pp. 543-565)

En este proceso emocional es importante distinguir los siguientes componentes:

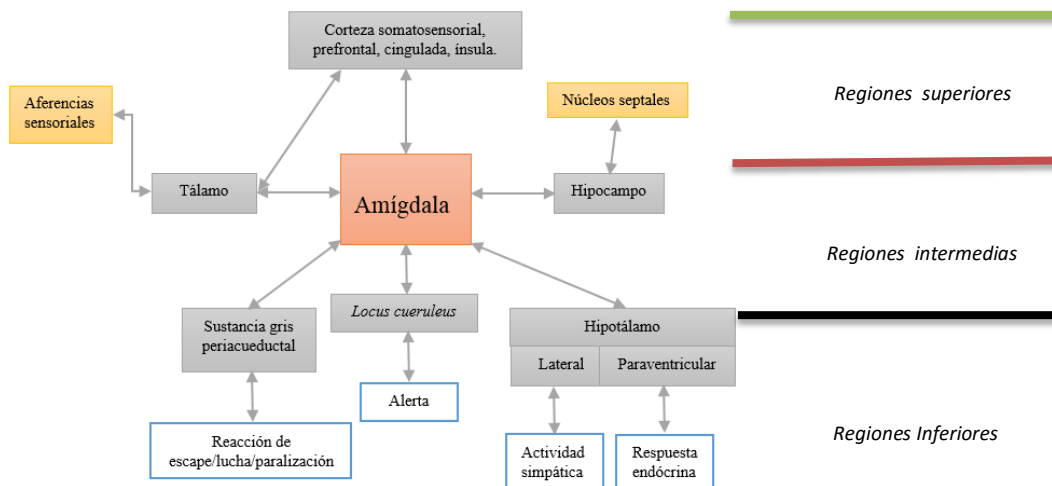
- La evaluación (valoración de estímulos y su posible relación con experiencias previas y condicionamientos)
- La expresión (respuesta afectiva con sus manifestaciones conductuales de tipo vegetativa, motóricas y endócrinas)
- La experiencia emocional (describe al sentimiento que acompaña a la respuesta)

Como es lógico todos estos componentes del proceso emocional deben tener una base neurológica mediante la cual existen mecanismos responsables de regular las respuestas emocionales, evitando así persistencia, condiciones excesivas e inapropiadas, capaces de ejercer una mala adaptación ante el estado del paciente.

Los estudios de ansiedad en modelos animales y los estudios de neuroimagen en humanos que padecen de ansiedad han permitido tener una visión coherente y consistente de los circuitos neuronales implicados en este trastorno (fig. 4-1).

Al hacer referencia a los círculos neuronales, es importante distinguir entre tres niveles de organización: las *regiones superiores corticales* (paralímbica y prefrontal) responsables de procesos cognitivos demandantes; las *regiones intermedias* (principalmente la amígdala y en menor nivel el sistema septohipocámpico) las cuales median las respuestas aprendidas que son aquellas con mayor nivel de elaboración, principalmente emocionales; por último las *regiones inferiores* que forman parte de la estructura del tronco del encéfalo (*Locus coeruleus*, sustancia gris periacueductal y el hipotálamo) son aquellas responsables de las manifestaciones automáticas simples. (Flórez, 2014, pp. 543-565)

A nivel de las regiones inferiores, la sustancia gris periacueductal es la encargada de recibir aferencias descendentes del sistema límbico y de la corteza paralímbica, y aferencias ascendentes que proceden de sistemas sensoriales; coordina las respuestas conductuales y autonómicas (huir, paralización o lucha), además se encuentra implicada en la respuesta analgésica ante el estrés agudo. El *locus coeruleus* por su parte es el principal núcleo noradrenérgico en el cerebro y se encarga de recibir aferencias del córtex, tálamo y sistema límbico; sus aferencias son las responsables de la conexión con todas aquellas áreas del cerebro que son responsables de las alteraciones conductuales, vegetativas y somáticas características de los estados de miedo y ansiedad. El rol principal de *locus coeruleus* se da en la alarma o estado de alerta, así también en el estado de hipervigilancia. El hipotálamo es el responsable de la respuesta endocrina natural ante el estrés (Flórez, 2014, pp. 543-565).



**Figura 4-1.** Circuitos neuronales responsables de la respuesta ansiosa

Fuente: (Flórez, 2014)

Elaborado por: (Orma, 2015)

De las estructuras subcorticales, la amígdala, órgano situado en la profundidad del lóbulo temporal (fig. 4-1 y fig. 5.1) es el que se ha relacionado de una manera más consistente con las emociones y la conducta derivada de esta, principalmente en la respuesta a estímulos de tipo negativo, además es la encargada de asociar el recuerdo con la emoción adecuada lo que permite la recuperación de la información. (Sánchez & Román, 2004, pp. 223-240) (FAE, 2012).

La información sensorial puede ser transmitida en dirección a los núcleos de la amígdala, sea directamente o una vez procesada por el tálamo, corteza prefrontal, corteza paralímbica y sensorial.

El núcleo lateral de la amígdala (primera interface para la información sensorial), a través de la cual la información se distribuye mediante proyecciones recíprocas hacia los núcleos amigdalares (principalmente núcleos basales y el núcleo central de la amígdala). De este núcleo se originan respuestas estructuradas debido a sus proyecciones hacia el tronco cerebral y el mesencéfalo (sustancia gris periacueductal y *locus coeruleus*); al hipotálamo lateral (donde se activa el sistema simpático responsable de la taquicardia, elevación de la PA, dilatación pupila, palidez, etc.); al núcleo ambiguo y al núcleo dorsal motor del vago (responsables de la activación del parasimpático, con manifestaciones como úlceras, diarrea, micciones, etc.); a los núcleos de los nervios trigémino y facial (responsables del origen de expresiones faciales de temor). Además, proyecciones hacia el hipotálamo, específicamente el núcleo paraventricular generan la respuesta endócrina ante el estrés, con participación del factor liberador de corticotropina (CRF) y la posterior activación del centro hipotálamo-hipófiso-suprarrenal; proyecciones al núcleo parabraquial origina disnea e hiperventilación; proyecciones a la zona tectal ventral producen la activación del sistema dopaminérgico mesocortical, que se dirige primordialmente hacia el núcleo de *accumbens*, así también hacia el caudado ventromedial y

putamen ventral, siendo responsables del origen de respuestas motoras bien organizadas (Flórez, 2014, pp. 543-565).

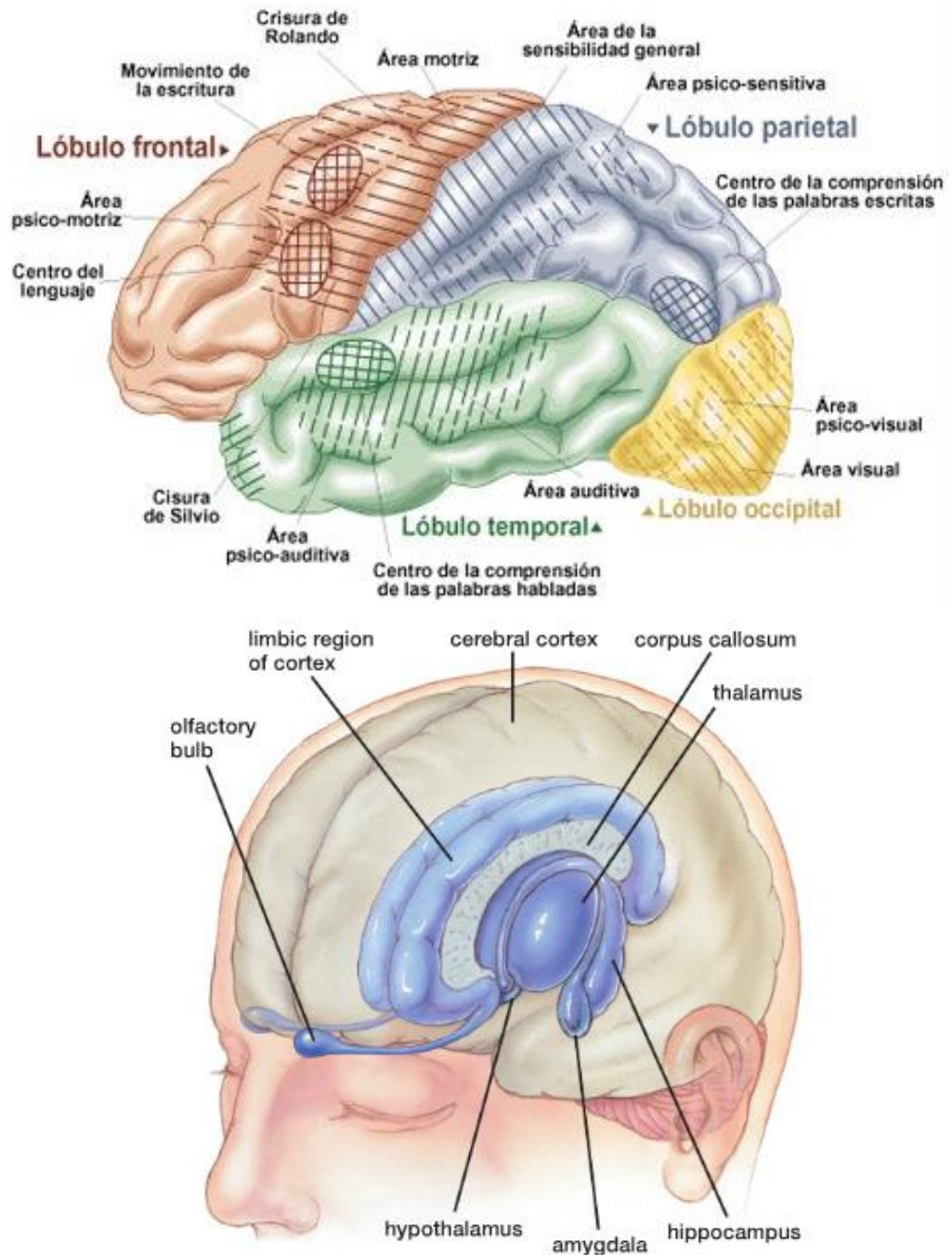
Por último Flórez establece que “la corteza prefrontal medial, la corteza angulada anterior y la corteza insular reciben importantes influencias de la amígdala, de naturaleza recíproca, así como del tálamo; merced a ellas se puede interpretar el significado de orden superior de los estímulos sensoriales, modificar las respuestas conductuales en razón de la experiencia, predecir las consecuencias sociales de una determinada conducta, etc”. La exagerada estimulación de estas regiones se ha vinculado a la interpretación errónea de los estímulos considerados amenazantes, la ansiedad anticipatoria, la predisposición ansiosa y los componentes interoceptivos del miedo (Flórez, 2014, pp. 543-565).

Los complejos circuitos neuronales de las respuestas conductuales se encuentran modulados por varios sistemas de neurotransmisores:

- ✓ Monoaminas (NA, A, dopamina, 5-HT)
- ✓ Aminoácidos (GABA y GlutamaTo)

Entre los diversos neuropéptidos que se vinculan con la respuesta ansiosa es importante destacar:

- ✓ El factor liberador de corticotropina
- ✓ El neuropéptido Y
- ✓ La colecistocinina
- ✓ La sustancia P
- ✓ La vasopresina, etc.



**Figura 5-1.** Centros nerviosos del cerebro (arriba), sistema límbico (abajo).  
Fuente: <https://diariodeltoc.wordpress.com/2008/06/10/3907/>. (Punset, 2008)

#### 1.3.4. *Tratamiento de la ansiedad*

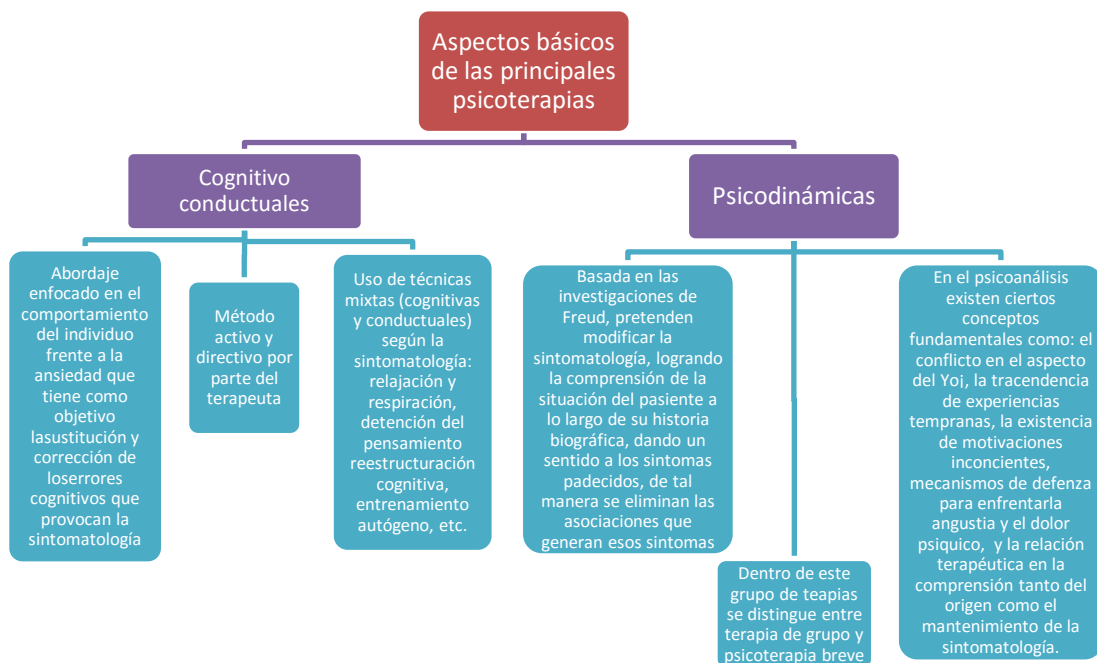
Los trastornos de ansiedad abarcan tratamientos afectivos en la mayoría de los sucesos, que ayudan a normalizar la calidad de vida del paciente de manera satisfactoria. Lo más usual es la combinación de una terapia farmacológica enfocada en los síntomas principales, en conjunto con un tratamiento psicoterapéutico enfocado hacia los pensamientos y conductas responsables del origen de la ansiedad, así como de su mantenimiento.

### 1.3.4.1. Alternativas terapéuticas

#### 1.3.4.1.1. Terapia psicológica

La psicoterapia o terapia psicológica es una terapia basada en la comunicación entre el terapeuta (psicólogo o médico) y el paciente, representando generalmente la alternativa de preferencia en atención primaria. La forma simple usualmente denominada terapia de «apoyo» la cual no consiste sino en una actitud de escucha por parte del terapeuta, en la cual se manifiesta una empatía hacia las ideas y sentimientos del paciente, permitiéndole expresar sus emociones y criterios, gracias a esto el paciente puede sentirse aliviado y reconfortado fortaleciendo su autonomía para solucionar la problemática de la ansiedad (Ferre & Camarillo, 2013, pp. 2749-2752).

A continuación se presenta un diagrama con los aspectos más relevantes de los tipos de psicoterapia.



**Figura 6-1.** Aspectos básicos de las principales psicoterapias

**Fuente:** (Ferre & Camarillo, 2013)

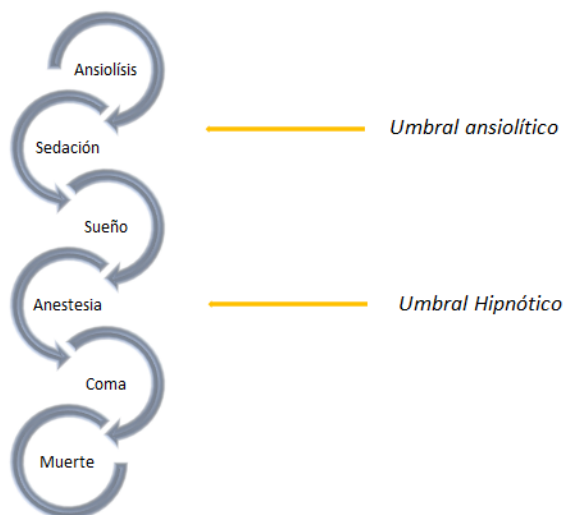
**Elaborado por:** (Orna, 2015)



### 1.3.4.1.2. Farmacoterapia

En la terapia farmacológica es fundamental el uso de ansiolíticos, definidos como fármacos que actúan contra la ansiedad, disminuyendo o suprimiendo la sintomatología física, psicológica o cognitiva.

En la actualidad se considera que los ansiolíticos no deben producir sedación y sueño, como lo señala Flores en su farmacología existe una tendencia marcada en la cual se considera al efecto ansiolítico como el primer escalón en una línea continuada de efectos progresivos: el de ansiolítico a sedante a hipnótico (véase figura 6), criterio planteado en función de los efectos observados por barbitúricos, benzodiacepinas y meprobamato. Las benzodiacepinas a diferencia de los barbitúricos se acercan más al ansiolítico ideal, ya que permite un mejor manejo en cuanto a efectividad y seguridad, aunque a dosis altas producen sedación y sueño (Flórez, 2014, pp. 543-565).



**Figura 7-1.** Efecto de las dosis crecientes de ansiolíticos (orden descendente).

Fuente: (Flórez, 2014)

Elaborado por: (Orma, 2015)

Un enorme avance en el estudio de los ansiolíticos se da a partir de la diferenciación de los subtipos de receptores GABA, que permiten explicar los mecanismos de acción por los cuales los ansiolíticos actúan, que además a futuro permite que se desarrollen nuevas moléculas con actividad ansiolítica de mayor especificidad. Otro enfoque de la farmacología de la ansiedad se basa en que muchos de los tratamientos de primera línea para este trastorno constituyen la terapia con antidepresivos, lo que sugiere un solapamiento terapéutico-fisiopatológico entre los trastornos depresivos y de ansiedad (Flórez, 2014, pp. 543-565).

Los ansiolíticos desde un punto de vista funcional pueden clasificarse en:

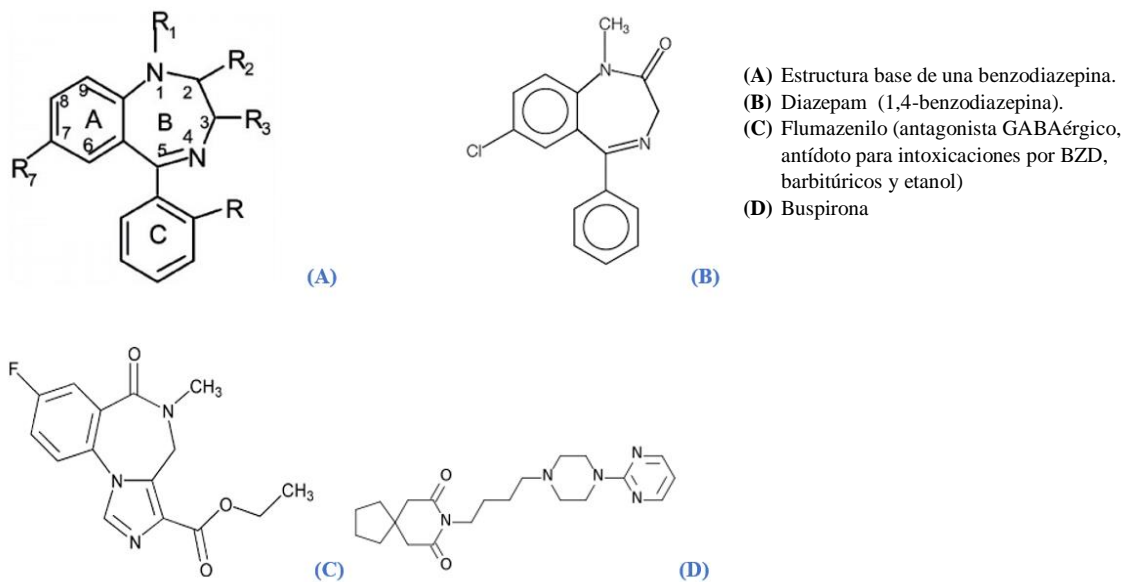
- A. Moduladores del receptor GABAA.
- B. Agonistas parciales de los receptores 5-HT1A.
- C. Antidepresivos
- D. Otros Fármacos (antihistamínicos, bloqueantes B-adrenérgicos, neurolépticos, anticonvulsivantes, algunos analgésicos)

En el presente trabajo se analizarán con mayor énfasis la familia de las benzodiazepinas debido a la relevancia de las mismas en el presente trabajo.

#### **A. Moduladores GABA<sub>a</sub> (Benzodiazepinas y derivados).**

##### **Características químicas**

El anillo común de este tipo de compuestos es el anillo benzodiazepínico (véase figura 8-1), que consiste en un anillo de siete elementos junto a un anillo aromático, con cuatro posiciones de posible sustitución, las cuales pueden ser modificadas sin sufrir pérdida de actividad; en su mayoría las BZD tienen en el anillo (B) los átomos de N en posición 1 y 4, aunque hay algunas moléculas que lo tienen en posición 1 y 5 (clobazam). Todas las moléculas contienen un radical en posición 7, generalmente Cl<sup>-</sup> (diazepam, oxazepam, temazepam, etc.) o NO<sub>2</sub> (nitrazepam, clonazepam y flunitrazepam.). En posición 1, algunas moléculas incluyen un radical metilo (diazepam y temazepam); puede presentarse con frecuencia un grupo carbonilo (COO<sup>-</sup>) en posición 2 y pueden hallarse hidroxiladas (OH<sup>-</sup>) en posición 3 (lorazepam y oxazepam). Debido a la introducción de anillos adicionales se ha podido obtener ejemplares derivados como las triazolobenzodiazepinas (alprazolam). (Flórez, 2014, pp. 543-565) (Dale., Farmacología, 2012, pp. 531-539).



**Figura 8-1.** Formulas químicas de algunos ansiolíticos y antagonistas.

Fuente: (Flórez, 2014)

Elaborado por: (Orna, 2015)

### Acciones Farmacológicas

La mayor parte de las benzodiazepinas actúa como ansiolíticos y como ya se mencionó temas atrás a diferentes dosis pueden producir hipnosis, miorelajación y efectos anticonvulsivantes, el diazepam es la estructura más representativa de esta familia; algunas benzodiazepinas como clonazepam se usan con fines sedativos.

Las benzodiazepinas están indicadas en el tratamiento de trastornos de ansiedad agudos, ansiedad refractaria y durante la primera semana de un tratamiento que requiera el uso conjunto con un fármaco de inicio de acción no tan rápido. En función de la división de los trastornos de ansiedad las BZD están indicadas para los tratamientos de ansiedad generalizada (tratamiento a corto plazo) a pesar de que los medicamentos de primera línea para este tipo constituyen los ISRS (véase tabla 7-1), no sucede así en los tratamientos de trastornos asociados a fobias, trastorno de estrés postraumático y trastorno obsesivo-compulsivo en donde no hay una adecuada respuesta a las benzodiazepinas, por último en los trastornos de angustia o pánico tan solo ciertas benzodiazepinas de elevada potencia se han mostrado eficaces (alprazolam, clonazepam, lorazepam) (Flórez, 2014, pp. 543-565) (Ferre & Camarillo, 2013, pp. 2747-2754) (Escamilla, 2011, pp. 5725-5733).

En personas que gozan de salud y a dosis terapéuticas aprobadas, las BZD no alteran las funciones físicas y mentales, pero a dosis mayores existe el riesgo de sueño, ataxia, letargia y debilidad muscular. En pacientes que presentan dicho trastorno alivian tanto síntomas objetivos

(sudor, molestias digestivas, taquicardia) como subjetivos (irritabilidad, hostilidad, etc.); su acción puede emplearse de forma profiláctica y curativa; en una cierta población además de aliviar ciertos síntomas del estado ansioso, pueden provocar el incremento de signos objetivos de hostilidad e irritabilidad (Flórez, 2014, pp. 543-565).

Esta familia de fármacos consta de buena tolerancia, lo que los convierte en una elección segura en el tratamiento a corto plazo, básicamente tienen acciones farmacológicas similares, aunque se ha descrito cierto grado de selectividad, para los 20 fármacos disponibles para su uso clínico (tabla 4-1). Las benzodiazepinas pueden combinarse con psicoterapia cognitiva, siendo de esta manera más seguro el manejo de altas dosis.

**Tabla 4-1.** Características de las benzodiazepinas en el ser humano.

Fármaco	Semivida del fármaco original (h)	Metabolito activo	Semivida del metabolito (h)	Duración global de la acción	Aplicaciones más importantes
Triazolam, <sup>a</sup> midazolam	2-4	Derivado hidroxilado	2	Ultracorta (<6 h)	Hipnótico El midazolam se usa como anestésico intravenoso
Zolpidem <sup>b</sup>	2	No	-	Ultracorta (~4 h)	Hipnótico
Loracepam, oxacepam, temacepam, lormetacepam	8-12	No	-	Corta (12-18 h)	Ansiolítico, hipnótico
Alprazolam	6-12	Derivado hidroxilado	6	Media (24 h)	Ansiolítico, antidepresivo
Nitracepam	16-40	No	-	Media	Hipnótico, ansiolítico
Diacepam, clordiacepóxido	20-40	Nordacepam	60	Larga (24-48 h)	Ansiolítico, relajante muscular El diacepam se usa como antiepiléptico
Fluracepam	1	Desmetilfluracepam	60	Larga	Ansiolítico
Clonacepam	50	No	-	Larga	Antiepiléptico, ansiolítico (sobre todo en la manía)

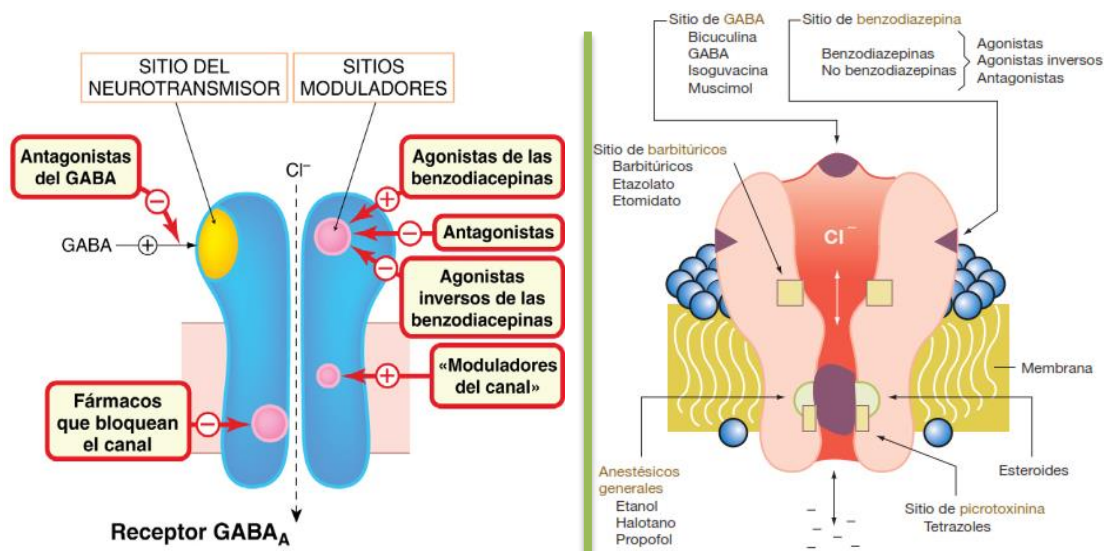
<sup>a</sup>El triazolam se retiró del mercado británico debido a sus efectos secundarios.  
<sup>b</sup>El zolpidem no es una benzodiazepina, pero actúa de forma similar. La zopiclona es similar.

Fuente: (Rang & Dale., 2012)

### Mecanismo de acción

Las BZD se fijan de manera específica a sitios estrechamente vinculados con las sinapsis GABA y también interactúan con un sitio específico localizado en el complejo molecular del receptor GABA; como resultado de esta interacción se produce una modulación alostérica en el complejo receptor (fig. 9-2), permitiendo una mayor influencia del GABA sobre su sitio específico de interacción, aumentando así la frecuencia de las aperturas de los canales de cloro, permitiendo la despolarización de las membranas celulares biológicas con una carga negativa menor a -70mV, que es la carga normal o de reposo de en la zona intracelular.

Al parecer el efecto producido por las benzodiazepinas no presenta cambios significativos en el tiempo medio de apertura del canal y la conductancia (Rang & Dale., Farmacología, 2012, pp. 531-539).



**Figura 9-2.** Complejo receptor GABA-ionóforo  $\text{Cl}^-$ , localización principal de los sitios de acción de los fármacos sobre el receptor GABA (Fig. izquierda) y ejemplos de xenobióticos en los diferentes espacios (Fig. derecha).

Fuente: (Rang & Dale., 2012) (Flórez, 2014)

Los estudios electrofarmacológicos cercioran que la región con mayor sensibilidad a la acción de las benzodiazepinas es el sistema límbico y, dentro de este, la amígdala y el hipocampo. Las acciones consisten en deprimir tanto la capacidad de respuesta ante estímulos eléctricos como la actividad neuronal basal; esta acción es aquella que diferencia a las BZD de otros ansiolíticos tipo barbitúricos y de los hipnóticos, los cuales al parecer tienen una actividad más generalizada a nivel reticular. Dado el rol que desempeñan la amígdala, el hipocampo y el septo en los trastornos de ansiedad, es posible relacionar la actividad ansiolítica con la acción depresora selectiva a este nivel (Flórez, 2014, pp. 543-565).

En este receptor no solo actúan como ligandos las benzodiazepinas clásicas, también lo hacen fármacos moduladores y bloqueadores del canal. Existen numerosos ejemplos de fármacos no benzodiazepínicos, hipnóticos (zopiclona, eszopiclona), ciclopirrolonas, imidazopiridinas (zolpidem), p-carbolinas (abecarnilo), pirazolopiridinas (zaleplón), alcohol, propofol, esteroides, entre otros (Véase figura 9 y tabla 5).

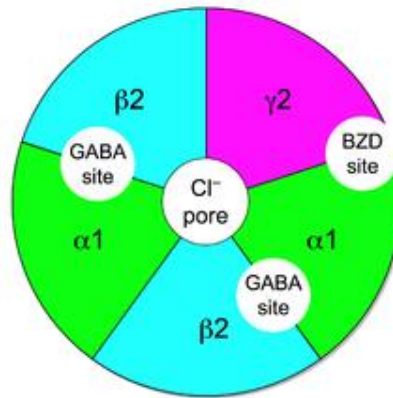
**Tabla 5-1.** Propiedades de los receptores de aminoácidos inhibidores.

	GABA <sub>A</sub>			GABA <sub>B</sub>	Glicina
	Sitio receptor	Sitio modulador (benzodiazepina)	Sitio modulador (otros)		
Agonistas endógenos	GABA	Desconocido; se han propuesto varios (v. texto)	Varios neuroesteroides (p. ej., metabolitos de la progesterona)	GABA	Glicina β-alanina Taurina
Otros agonistas	Muscimol Gaboxadol (THIP, <sup>a</sup> agonista parcial)	Benzodiazepinas ansiolíticas (p. ej., diazepam)	Barbitúricos Anestésicos esteroideos (p. ej., alfaxolona)	Baclofeno	–
Antagonistas	Bicuculina Gabacina	Flumazenilo (¿agonista inverso?)	–	2-hidroxisaclofeno CGP 35348 y otros	Estricnina
Bloqueantes del canal	Picrotoxina <sup>b</sup>			No procede	–
Mecanismos efectores	Canal de cloruro controlado por ligando			Receptor acoplado a proteínas G; inhibición de adenilato ciclasa, inhibición de canales de Ca <sup>2+</sup> , activación de canales de K <sup>+</sup>	Canal de cloruro controlado por ligando
Localización	Extensa; sobre todo en interneuronas GABAérgicas			Pre- y postsináptica Extensa	Postsináptica Sobre todo en tronco del encéfalo y médula espinal
Función	Inhibición postsináptica (ppsi rápidos e inhibición tónica)			Inhibición presináptica (reduce la entrada de Ca <sup>2+</sup> ) Inhibición postsináptica (incrementa la permeabilidad al K <sup>+</sup> )	Inhibición postsináptica (ppsi rápidos)

<sup>a</sup>THIP es la abreviatura del nombre químico del gaboxadol. Se ha publicado que presenta preferencia por los receptores GABA<sub>A</sub> que contienen subunidades δ.  
<sup>b</sup>La picrotoxina también bloquea los receptores de glicina que contienen subunidades α, pero no los receptores heteroméricos de glicina.  
 ppsi, potencial postsináptico inhibitor.

**Fuente:** (Rang & Dale., 2012)

El receptor GABA tiene naturaleza proteica pentamérica, en la cual se distingue las subunidades α, β, γ, δ, ε, θ y ρ; las cuales a su vez poseen seis subtipos de subunidades α, tres subtipos de subunidades β, tres subtipos de unidades γ y 3 subtipos de subunidades ρ. (Flórez, 2014, pp. 543-565) (Rang & Dale, 2012, pp. 531-539) (Callado, 2011, pp. 71-94). De las subunidades antes mencionadas las más importantes desde el punto de vista afectivo son las subunidades α, β, γ; las BZD solo se unen a la interface α-γ, específicamente a los receptores que presenten las subunidades γ<sub>2</sub> y α<sub>1,2,3,5</sub> (fig. 10). Mediante enfoques genéticos se ha discernido la acción sedante de la subunidad α<sub>1</sub> de las acciones ansiolíticas presentadas por las subunidades α<sub>2,3</sub>: hoy en día los esfuerzos se enfocan en elaborar fármacos ansiolíticos con selectividad α<sub>2</sub> y α<sub>3</sub>, con efecto ansiolítico pero sin los efectos adversos de sedación y amnesia) (Rang & Dale, 2012, pp. 531-539).



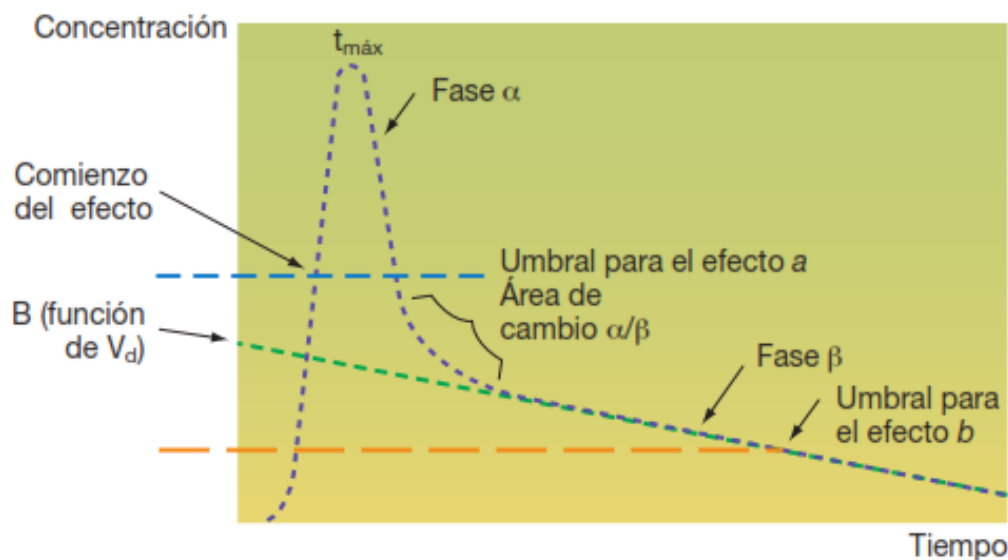
**Figura 10-1.** Esquema estructural de un receptor GABA<sub>A</sub> en donde se presenta los sitios de unión específicos para una Benzodiazepina y el aminoácido GABA.

Fuente: (Richter, y otros, 2010)

Las benzodiazepinas en presentación oral son bien absorbidas, usualmente en un tiempo menor a 1h alcanzan la Concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ), aunque algunas de ellas son de absorción más lenta; la rapidez de absorción varía en función del grado de liposolubilidad, atraviesa bien la barrera hematoencefálica (BHE) y el equilibrio entre plasma y cerebro se logra rápidamente gracias a su liposolubilidad, por lo tanto en dosis única la velocidad de absorción es el factor determinante para el inicio de acción y el  $t_{max}$ .

Por vía parenteral intramuscular la absorción es bastante errática, irregular y lenta (en particular diazepam y clordiazepóxido), probablemente debido a la afinidad con el tejido adiposo adyacente, siendo los fármacos mejor absorbidos por esta vía el lorazepam y midazolam (Flórez, 2014, pp. 543-565) (Rang & Dale, 2012, pp. 531-539).

A nivel de distribución presentan un alto grado de unión al sitio II de la albúmina humana, siendo la fracción libre totalmente independiente de la Concentración plasmática total ( $C_{pT}$ ). La unión a proteínas plasmáticas (UPP) no tiene relevancia clínica sino en casos de insuficiencia renal y quemaduras. Las benzodiazepinas acusan un modelo bicompartimental (fig. 11-1), obsérvese la posible diferenciación en la concentración plasmática necesaria para producir dos efectos distintos (a y b), y la duración de cada uno de ellos, en el cual el proceso de distribución se da desde el compartimiento central hasta los compartimentos periféricos (musculo o tejido adiposo). Aquellos fármacos con mayor liposolubilidad (p.ej., diazepam y midazolam) presentan una fase inicial de distribución muy veloz, después de la administración de una dosis única intravenosa, después de un tiempo de 30 minutos las  $C_p$  pueden caer hasta en 10 veces (Flórez, 2014, pp. 543-565).



**Figura 11-1.** Curso temporal de una BZD administrada por vía oral, que sigue un modelo bicompartimental

Fuente: (Rang & Dale., 2012)

El metabolismo de esta familia de fármacos resulta bastante complejo ( fig. 12), los principales procesos metabólicos resultan mediados por la citocromo CYP3A4, responsables de reacciones de oxidación por oxidasas mixtas microsómicas (Hidroxilación y N-desalquilación ), además ciertos fármacos como clonazepam y nitrazepam sufren nitroreducción.

La oxidación es una vía designada como «susceptible», ya que puede verse alterada por agentes como una enfermedad hepática, la edad o los inhibidores metabólicos (estrógenos, cimetidina, disulfiram, omeprazol, etc.),entre otros. No sucede así a nivel de conjugación, donde estos factores antes mencionados apenas tienen importancia.

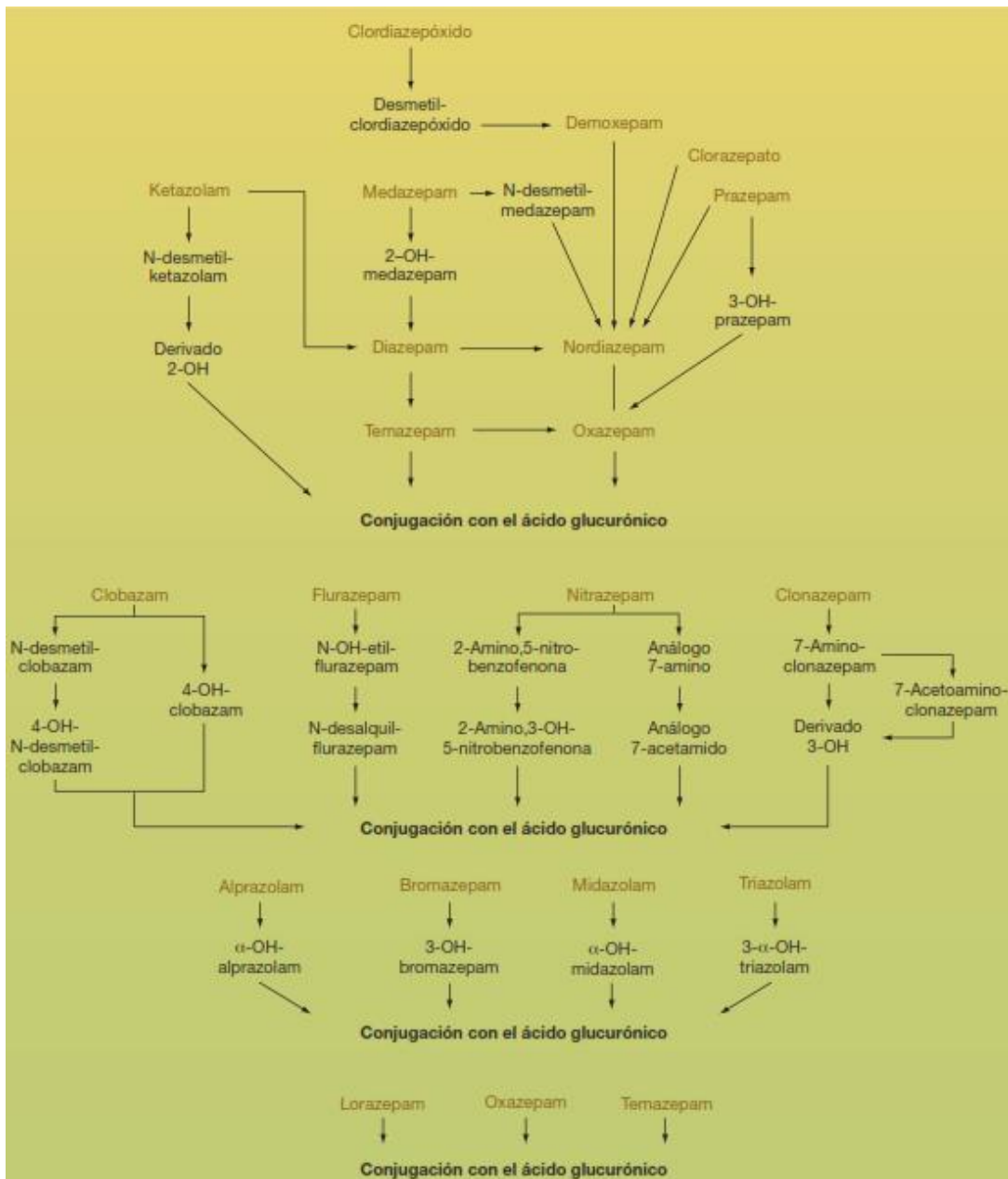
Las benzodiazepinas generalmente son excretadas por vía urinaria como conjugados glucorónidos; la duración durante la cual tiene una acción terapéutica varía mucho, debido a esto existe una clasificación clásica de las benzodiazepinas en aquellas de acción corta, intermedia y prolongada (tabla 6-1) (Flórez, 2014, pp. 543-565) (Rang & Dale, 2012, pp. 531-539).

El uso de las diversas benzodiazepinas se ve influida por la duración de acción, de este modo los fármacos con un periodo de acción prolongado son más útiles como anticonvulsivos y ansiolíticos mientras los fármacos de acción corta son eficaces como hipnóticos debido a un escaso efecto de resaca al despertar (Rang & Dale, 2012, pp. 531-539).

En tratamientos prolongados el  $t_{1/2}$  es el factor que condiciona la frecuencia de administración en función del tiempo estimado para alcanzar los niveles estables. En este caso benzodiazepinas como el diazepam que presentan  $t_{1/2}$  prolongado, se espera que la actividad ansiolítica sea



creciente hasta que logre alcanzar el nivel máximo estable después de varios días de administración, tras el cual existe el riesgo de acumulación, que puede llevar a niveles excesivos con consecuencias como miorrelajación, sueño y sedación.



**Figura 12-1.** Vías metabólicas de las principales benzodiazepinas.  
Fuente: (Flórez, 2014)

**Tabla 6-1.** Características farmacocinéticas de las Benzodiazepinas.

	$t_{max}$ (h)	$t_{1/2\beta}$ (h)	$V_d$ (L/kg)	Unión a proteínas (%)	Liposolubilidad relativa
<b>De acción corta</b>					
Midazolam	0,3	1,3-3,1	50,2	96	1,54
Triazolam	1,2	2,2		77	0,64
<b>De acción intermedia</b>					
Alprazolam		6-20		70	0,54
Bromazepam	1	10-20		70	0,24
Flunitrazepam	1	15-30		78	0,31
Ketazolam		6-25		96	—
Lorazepam	1-2	9-22	0,7-1	85	0,48
Lormetazepam	1-2	8-10			0,22
Nitrazepam	1	18-31	1,5-2,7	86	0,29
Oxazepam	2-4	4-13	0,6	90	0,45
<b>De acción larga</b>					
Clobazam	1-4	9-30		87-90	0,4
Clorazepato <sup>a</sup>	0,9	24-60		82	—
Clordiazepóxido	1-4	6-28	0,2-0,6	94-97	—
Diazepam		20-100 <sup>b</sup>	0,9-2	96-98	1
Flurazepam	1		3-4		—
Medazepam	1-2	1-2 <sup>c</sup>		98-99	—
Nordiazepam		40-100	0,9-1,2	97,6	0,79
<sup>a</sup> Como N-desmetildiazepam. <sup>b</sup> Su metabolito N-desalquilflurazepam tiene $t_{1/2\beta}$ de 51-100 h. <sup>c</sup> Sus numerosos metabolitos activos tienen semivida larga.					

Fuente: (Flórez, 2014)

## Efectos adversos e interacciones

Los efectos adversos causados por el tratamiento con benzodiazepinas pueden resumirse en:

- Efectos tóxicos, a causa de una sobre dosis aguda
- Efectos adversos producidos en el transcurso de su uso terapéutico usual.
- Tolerancia y dependencia

Dentro del primer grupo la sobredosis aguda por benzodiazepinas representa un problema significativamente menos peligroso que otros ansiolíticos e hipnóticos, provocando un sueño prolongado, sin presentar depresión grave de las funciones de los sistemas cardiovascular y respiratorio. En situaciones en las cuales la administración de benzodiazepinas se da concomitantemente con el uso de otros depresores del SNC (p. ej., alcohol), los efectos a nivel de los sistemas cardiovascular y respiratorio pueden suponer depresiones graves. Varias son las consecuencias del uso de benzodiazepinas como estupefacientes, también se han utilizado para fines delictivos y autolíticos, por lo que la disponibilidad de un antagonista eficaz es

fundamental, el flumazenilo es el antídoto de uso clínico más efectivo en el tratamiento de intoxicaciones agudas empleado en dosis de 0,2 a 4mg (Rang & Dale, 2012, pp. 531-539).

En el uso terapéutico frecuente de las benzodiazepinas los principales efectos adversos constituyen confusión, somnolencia, amnesia (más frecuente con BZD potentes como lorazepam), ataxia, disartria, coordinación deficiente que afecta al desempeño motriz considerablemente. (p. ej., manejo de maquinaria y vehículos; así como de respuestas que requieren reflejos motores finos en la expresión) (Rang & Dale, 2012, pp. 531-539).

Efectos menos frecuentes se presentan en la conducta, en la cual puede manifestarse hostilidad y agresividad, e incluso un estado inicial con cierto grado de nerviosismo ante de que el efecto ansiolítico surta efecto. Los preparados de acción corta que son utilizados en mayor grado para el tratamiento hipnótico frecuentemente pueden presentar efecto rebote con el cese de la acción del fármaco, particular en el cual debe emplearse una alternativa de acción prolongada o intermedia.

Por vía intravenosa los efectos secundarios manifestados pueden ser hipotensión y depresión respiratoria, aunque su capacidad letal es muy reducida. Como ya se trató párrafos atrás las interacciones a nivel farmacodinámica se dan principalmente con otros supresores del SNC, en el cual los fenómenos de desinhibición y depresión pueden verse potenciados por opiáceos, barbitúricos, alcohol, antihistamínicos sedantes, etc. (Flórez, 2014, pp. 543-565)

Específicamente para el caso del diazepam no se encuentra suficientemente claro su acción teratógena en forma de labio leporino, pero se considera prudente evitar su uso durante el primer trimestre del embarazo; así también en casos excepcionales pueden presentarse reacciones hematológicas, hepáticas y dérmicas. Está totalmente demostrado que tanto fenitoína como fenobarbital inducen el metabolismo de diazepam.

Todas la benzodiazepinas generan tolerancia de manera gradual (es decir un incremento progresivo de la dosis necesaria para el paciente), así como dependencia que puede ser física como psicológica. La tolerancia se aprecia mejor en los tratamientos prolongados y no se conoce bien en qué grado se desarrolla tolerancia al efecto ansiolítico. La dependencia puede presentarse a dosis bajas en el cual se manifiesta un síndrome de abstinencia que tras la supresión gradual del fármaco se instaura lentamente (para el diazepam los síntomas de abstinencia pueden tardar hasta 3 semanas en aparecer); la sintomatología del cuadro es difusa debido a que es complejo diferenciar si se trata de una reacción por retirada del fármaco o una recaída del cuadro ansioso. En dependencia de la situación del paciente el síndrome puede ser mayor (alucinaciones, delirio, convulsiones y confusión marcada) o menor (insomnio, ansiedad,

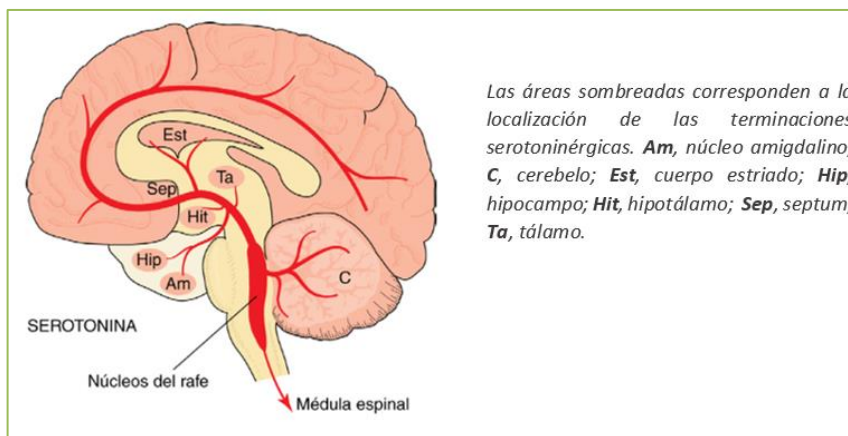
despersonalización, alteraciones sensoriales y somáticas) y adquiere mayor intensidad mientras más prolongado es el tratamiento y a dosis más altas.

Datos epidemiológicos presentan que aproximadamente el 35% de los pacientes que siguen un tratamiento con benzodiazepinas en un tramo de más de 4 semanas desarrollan dependencia física, así también la interrupción brusca del tratamiento después de semanas o meses puede conducir un efecto rebote así como pérdida de peso, temblor, mareo, acúfenos y trastornos del sueño debido a potenciación de la fase REM. Las benzodiazepinas que presentan un mayor potencial de dependencia en términos de latencia y gravedad, son aquellas con mayor potencia y con un  $t_{1/2}$  de eliminación menor (Flórez, 2014, pp. 543-565) (Rang & Dale, 2012, pp. 531-539).

La dependencia y tolerancia puede verse reducida al disminuir gradualmente a dosis administrada y en períodos intermitentes, que pueden verse acompañadas del uso concomitante con extractos naturales con actividad ansiolítica que pueden contribuir a reducir el síndrome de dependencia.

## B. Agonistas parciales de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>.

Los fármacos de esta familia son utilizados principalmente como antidepresivos (antidepresivos de segunda generación), también son considerados por las guías internacionales como una opción de primera línea para el tratamiento de ansiedad (tabla 8-1), razón por la cual en este trabajo se los estudia por separado de los antidepresivos de primera generación y de los demás compuestos con esta actividad; su acción radica en una inhibición neuronal a nivel de los receptores 5HT<sub>1A</sub>, receptores relacionados con procesos ansiosos (tabla 7-1). Este grupo incluye fluoxetina, sertralina, paroxetina, fluvoxamina, escitalopram y citalopram.



**Figura 13-1.** Esquema de las vías de la 5HT en el encéfalo

Fuente: (Rang & Dale, 2012)

Elaborado por: (Oma, 2015)

La distribución de las neuronas que presentan en su matriz 5-HT (véase figura 13) es similar aquella correspondiente a las neuronas noradrenérgicas. Sus cuerpos celulares se agrupan en la parte superior y en la protuberancia del bulbo raquídeo, cerca de la línea media también denominada rafe, por lo que usualmente son denominados núcleos de rafe. Los núcleos en la situación rostral son proyectados mediante el haz proencefálico medial a varias zonas de la corteza, entre ellos el hipocampo, los núcleos de la base, el hipotálamo y sistema límbico. Las células con mayor caudal son proyectadas hacia la médula espinal, el bulbo raquídeo y el cerebelo (Rang & Dale, 2012, pp. 531-539).

**Tabla 7-1.** Fármacos significativos que actúan sobre los principales subtipos de 5-HT.

<b>Tabla 15.1 Fármacos significativos que actúan sobre los principales subtipos de receptores 5-HT</b>					
Receptor	Localización	Función principal	Sistema de señalización	Fármacos significativos	
				Agonistas	Antagonistas
5-HT <sub>1A</sub>	SNC	Inhibición neuronal Efectos conductuales: sueño, alimentación, termorregulación, ansiedad	Proteína G (G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> ) ↓ AMPc (puede también modular los canales de Ca <sup>2+</sup> )	Buspirona (AP) 5-CT 8-OH-DPAT	Ergotamina (AP)
5-HT <sub>1B</sub>	SNC, músculo liso vascular, muchas otras localizaciones	Inhibición presináptica Efectos conductuales Vasoconstricción pulmonar		Ergotamina (AP) Triptanos	Metitepeina
5-HT <sub>1C</sub>	SNC, linfocitos	–		–	–
5-HT <sub>1D</sub>	SNC, vasos sanguíneos	Vasoconstricción cerebral Efectos conductuales: locomoción		5-CT Triptanos	Ergotamina (AP)
5-HT <sub>1E</sub>	SNC	–		–	–
5-HT <sub>1F</sub>	SNC, útero, corazón, tubo digestivo	–		¿Triptanos?	–
5-HT <sub>2A</sub>	SNC, SNP, músculo liso, plaquetas	Excitación neuronal Efectos conductuales Contracción del músculo liso (intestino, bronquios, etc.) Agregación plaquetaria Vasoconstricción/ vasodilatación	Proteína G (G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> ) ↓ IP <sub>3</sub> , Ca <sup>2+</sup>	LSD (SNC) α-Me-5-HT	Kefanserina Ciproheptadina Pizotifeno (NS) Metisergida LSD (periferia)
5-HT <sub>2B</sub>	Fondo gástrico	Contracción		LSD α-Me-5-HT	
5-HT <sub>2C</sub>	SNC, linfocitos	–		LSD α-Me-5-HT	Metisergida
5-HT <sub>3</sub>	SNP, SNC	Excitación neuronal (autónoma, neuronas nociceptivas) Emesis Efectos conductuales: ansiedad	Canal catiónico controlado por ligandos	2-Me-5-HT Clorometil biguanida	Dolasetrón Granisetrón Ondansetrón Palonosetrón Tropisetrón
5-HT <sub>4</sub>	SNP (tubo digestivo), SNC	Excitación neuronal Motilidad GI	Proteína G (G <sub>s</sub> ) ↑ AMPc	Metoclopramida 5-metoxitriptamina	–
5-HT <sub>5A</sub>	SNC	¿Modulación de la conducta exploratoria (roedores)?	Como arriba	–	–
5-HT <sub>6</sub>	SNC, leucocitos	¿Aprendizaje y memoria?	Como arriba	–	–
5-HT <sub>7</sub>	SNC, tubo digestivo, vasos sanguíneos	¿Termorregulación? ¿Ritmo circadiano?	Como arriba	LSD 5-CT	–

Los fármacos en cursiva no tienen aplicación clínica. AP, agonista parcial; 5-CT, 5-carboxamidotriptamina; DAG, diacilglicerol; GI, gastrointestinal; IP<sub>3</sub>, inositol trifosfato; LSD, dietilamida del ácido lisérgico; α-Me-5-HT, α-metil-5-hidroxitriptamina; 2-Me-5-HT, 2-metil-5-hidroxitriptamina; NS, no selectivo; 8-OH-DPAT, 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina; SNC, sistema nervioso central; SNP, sistema nervioso periférico.  
El sistema de clasificación de receptores está tomado de Hoyer et al. (2009) IUPHAR database at <http://www.iuphar-db.org>.  
La lista de agonistas y antagonistas incluye solamente los compuestos más conocidos. Actualmente se están desarrollando numerosos nuevos ligandos selectivos de receptores 5-HT, conocidos solo por los números de codificación.

Fuente: (Rang & Dale, 2012)

Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> pueden ser definidos como autorreceptores somatodendríticos para las neuronas tipo 5-HT en los núcleos del rafe, presentando un efecto autoinhibidor el cual tiende a limitar la frecuencia del número de impulsos emitidos por estas células.

**Tabla 8-1.** Dosis diaria recomendada en el tratamiento farmacológico de los trastornos de ansiedad.

	Primera línea		Segunda línea		Otras alternativas	
	Fármaco	Dosis (mg)	Fármaco	Dosis (mg)	Fármaco	Dosis (mg)
Trastorno por ansiedad generalizada	Escitalopram	10-20	Clonazepan	2-8	Quetiapina	50-300
	Paroxetina	20-40	Diazepam	10-30	Buspirona	10-20
	Sertralina	50-100	Cloracepato	15-45	Hidroxicina	25-75
	Fluoxetina	20-40	Imipramina	50-100		
	Fluvoxamina	100-300	Clomipramina	75-150		
	Venlafaxina	75-225	Pregabalina	75-300		
	Duloxetina	60-120				
Trastorno por crisis de angustia o pánico	Escitalopram	10-20	Clonazepan	2-8	Quetiapina	50-300
	Paroxetina	20-40	Diazepam	10-30	Valproato	300-1000
	Sertralina	50-100	Alprazolam	2- 6	Gabapentina	300-800
	Fluoxetina	20-40	Lorazepam	2-4		
	Fluvoxamina	100-300	Mirtazapina	15-30		
	Citalopram	10-30	Venlafaxina	75-300		
	Clomipramina	75-150				
	Imipramina	50-100				
Fobia simple	Paroxetina	20-40	Escitalopram	10-20		
Fobia social	Sertralina	50-200	Clonazepam	2-10		
	Fluvoxamina	100-300				
	Escitalopram	10-20				
	Paroxetina	20-40				
	Venlafaxina	75-150				

Fuente: (Ferre & Camarillo, 2013)

### Características farmacocinéticas

Los ISRS se absorben bien por vía oral, y la mayoría presenta  $t_{1/2}$  plasmáticas de 18 a 24 horas, a excepción de la fluoxetina que tiene un  $t_{1/2}$  plasmático entre 24-96h. La aparición del efecto terapéutico se da entre la segunda y la cuarta semana. Tanto sertralina, fluoxetina y citalopram dan lugar a metabolitos activos producto de su desmetilación principalmente; el metabolito activo de la fluoxetina (norfluoxetina) presenta una semivida que varía desde los siete a los cinco días (tabla 11-1). (Flórez, 2014, pp. 543-565)

## **Efectos adversos**

Los efectos adversos que se presentan con más frecuencia son: insomnio, pérdida de libido, náuseas, anorexia y anorgasmia. Varios de estos efectos adversos son consecuencia de la estimulación o acción potenciada de los receptores 5-HT postsinápticos debido a que los ISRS son causantes de un aumento de la concentración extracelular de serotonina. Los efectos adversos pueden ser una respuesta a una estimulación inespecífica e incorrecta (p. ej., estimulación de un receptor 5HT<sub>2</sub>, 5HT<sub>3</sub>, 5HT<sub>4</sub>), o a su vez puede tratarse de una estimulación del receptor correcto (5HT<sub>1A</sub>) pero en una zona incorrecta del encéfalo.

### **C. Fármacos de acción antidepresiva**

La distinción entre los trastornos de ansiedad y depresión no siempre es lo suficientemente clara, inclusive pueden existir estados en los que se superponen las sintomatologías, a lo cual muchos profesionales pueden asumir estados mixtos de ansiedad-depresión (Flórez, 2014, pp. 543-565). La eficacia de antidepresivos tricíclicos (antidepresivos de primera generación) ha sido comprobada en fármacos como la imipramina.

El principal problema resultante de este tipo de tratamiento es la adherencia, debido a que los efectos secundarios (sedación, boca seca, disfunción sexual, taquicardia, hipotensión postural) lo hacen menos aceptables frente a otros tratamientos, constituyéndose así como fármacos de segunda y tercera línea. A pesar de ser poco utilizados, su principal indicación radica en trastornos obsesivo-compulsivos y conductas obsesivo-compulsivas (Rang & Dale, 2012, pp. 531-539).

**Tabla 9-1.** Tratamiento farmacológico del trastorno obsesivo-compulsivo.

	Dosis mínima recomendada (mg/día)	Dosis máxima recomendada (mg/día)
Paroxetina	20	60
Sertralina	50	200
Fluvoxamina	150	300
Fluoxetina	40	80
Citalopram	20	60
Escitalopram	20	40
Clomipramina	150	250

Modificada de Dell'Osso B, et al<sup>28</sup>.

Fuente: (Schalatter & Gamazo., 2011)

**Tabla 10-1.** Tipos y características de los antidepresivos.

Tipo y ejemplos	Acción	Efectos adversos	Riesgo de sobredosis	Farmacocinética	Observaciones
<b>Inhibidores de la recaptación de monoaminas</b>					
<b>(1) ISRS</b>	Todos muy selectivos para 5-HT	Náuseas, diarrea, agitación, insomnio, anorgasmia Inhiben el metabolismo de otros fármacos con el consiguiente riesgo de la recaptación	Bajo riesgo de sobredosis, pero no deben utilizarse en combinación con IMAO	—	—
Fluoxetina	Como antes	Como antes	Como antes	t <sub>1/2</sub> prolongada (24-96 h)	—
Fluvoxamina	Como antes	Como antes	Como antes	t <sub>1/2</sub> 18-24 h	Menos náuseas que los demás ISRS
Paroxetina	Como antes	Como antes	Como antes	t <sub>1/2</sub> 18-24 h	Reacción de abstinencia
Citalopram	Como antes	Como antes	Como antes	t <sub>1/2</sub> 24-36 h	—
Escitalopram	Como antes	Como antes	Como antes	t <sub>1/2</sub> 24-36 h	Isómero S activo del citalopram Menos efectos adversos
Sertralina	Como antes	Como antes	Como antes	t <sub>1/2</sub> 24-36 h	—
<b>(2) Grupo de ATC clásicos</b>	Inhibición de la recaptación de NA/5-HT	Sedación Efectos anticolinérgicos (sequedad de boca, estreñimiento, visión borrosa, retención urinaria, etc.) Hipotensión postural Convulsiones Impotencia Interacción con depresores del SNC (especialmente alcohol, IMAO)	Arritmias ventriculares Alto riesgo en combinación con depresores del SNC	—	Antidepresivos de «primera generación», aún muy utilizados, aunque, en general, los nuevos fármacos tienen menos efectos secundarios y menor riesgo de sobredosis
Imipramina	No selectivo	Como antes	Como antes	t <sub>1/2</sub> 4-18 h; se convierte en desipramina	—
Desipramina	Selectivo para NA	Como antes	Como antes	t <sub>1/2</sub> 12-24 h	—
Amiriptrilina	No selectivo	Como antes	Como antes	t <sub>1/2</sub> 12-24 h; se convierte en nortriptilina	Muy utilizado, también en el dolor neuropático (capítulo 41)
Nortriptilina	Selectivo para NA (ligero)	Como antes	Como antes	t <sub>1/2</sub> prolongada (24-96 h)	Larga duración, menos sedante
Clomipramina	No selectivo	Como antes	Como antes	t <sub>1/2</sub> 18-24 h	Se usa también en los trastornos de ansiedad
<b>(3) Otros inhibidores no selectivos</b>					
Venlafaxina	Inhibidor débil y no selectivo de la recaptación de NA/5-HT También posee efectos no selectivos de bloqueo de receptores	Como los ISRS Síntomas de abstinencia frecuentes y molestos si se omiten dosis	Seguro en caso de sobredosis	t <sub>1/2</sub> breve (~5 h); se convierte en desvenlafaxina, que inhibe la recaptación de NA	Se dice que actúa con mayor rapidez que otros antidepresivos y que funciona mejor en los pacientes «resistentes al tratamiento» Se suele clasificar como inhibidor no selectivo de la captación de NA/5-HT, aunque in vitro muestra selectividad para 5-HT

Fuente: (Rang & Dale., 2012)



**Tabla 11-1.** Características farmacocinéticas de los antidepresivos.

Fármacos	Isozimas CYP	Metabolitos activos	T <sub>1/2</sub> (h)	Dosis habitual (mg/día)	Dosis extremas (mg/día)
<b>Tricíclicos terciarios</b>					
Amitriptilina	CYP1A2, 2D6, 3A3/4	Nortriptilina	9-38	100-200	25-300
Clomipramina	CYP1A2	Desipramina	17-28	100-200	25-300
Doxepina			11-23	100-200	25-300
Imipramina	CYP1A2, 2C19, 2D6	Desipramina	9-28	100-200	25-300
Trimipramina			9-11	75-200	25-300
Dosulepina		Nortiadén, dosulepina-N-óxido	20-24	75-150	50-250
<b>Tricíclicos secundarios</b>					
Amoxapina			8-30	200-300	50-600
Bupropión			20	200-300	100-450
Desipramina	CYP2D6	Desmaprotilina, maprotil-N-óxido	17-27	100-200	25-300
Maprotilina	CYP2D6		10-40	100-150	25-225
Nortriptilina	CYP2D6, 3A4, 1A2		16-90	75-150	25-250
<b>ISRS</b>					
Citalopram	CYP3A4	Di-desmetilcitalopram	33	20-40	10-60
Escitalopram	CYP2C19, 3A4, 2D6	Di-desmetilescitalopram	30	20-40	10-60
Fluoxetina	CYP2D6, Moderado 2C9/19, 3A4	Norfluoxetina	24-72	20-40	5-50
Fluvoxamina	CYP1A2, 2D6		15-22	100-200	50-300
Paroxetina	CYP2D6		20	20-40	10-50
Sertralina	CYP2C9/19, 3A4, 2D6	Desmetilsertralina	25	100-150	50-200
Vilazodona	CYP3A4		25	10-40	
<b>Varios</b>					
Agomelatina	CYP1A2 CYP2C9/19 (10%)		1-2	25-50	
Duloxetina	CYP1A2, 2D6		12	60-120	30-120
Mianserina	CYP2D6	Desmetil-OH-mianserina	6-40	60-90	30-200
Mirtazapina	CYP3A4	Desmetilmirtazapina	20-40	15-45	7,5-45
Reboxetina	CYP2D6, 1A2, 3A4		13	4-8	4-12
Trazodona	CYP3A4		6-10	150-200	50-600
Venlafaxina	CYP2D6	O-desmetilvenlafaxina	5	72-225	25-375

ISRS: inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina.

Fuente: (Flórez, 2014)

#### D. Otros fármacos

En este grupo de Fármacos se encuentra la bupiriona (véase figura 8-1), la cual se utiliza para tratar los trastornos de ansiedad generalizada, siendo ineficaz en los trastornos de angustia y crisis de pánico. Su mecanismo de acción es diferente al que presentan las benzodicepinas pues su mecanismo de acción no está vinculado al receptor GABA, carece de acción hipnótica,

miorrelajante y anticonvulsivante. Más que sedación produce insomnio. No provoca alteraciones en la memoria ni tampoco trastornos cognitivos o psicomotores. No interactúa con depresores del SNC, incluido el alcohol.

No se ha descrito abstinencia ni el desarrollo de dependencia física; además, pueden producir disforia, por lo tanto no induce al abuso. Se ha demostrado que su eficacia ansiolítica es semejante a la de las benzodiazepinas, pero la principal contrariedad es la lentitud con la que se da el inicio de acción terapéutica, ya que la actividad ansiolítica puede tardar hasta 2 semanas en instaurarse. Los pacientes tratados previamente con benzodiazepinas no se sienten igual de aliviados por la buspirona. Este fenómeno podría tener relación con la existencia en estos pacientes de sintomatología de abstinencia a las benzodiazepinas. (Flórez, 2014, pp. 543-565) (Rang & Dale, 2012, pp. 531-539).

Funcionalmente, la buspirona así como sus derivados actúan como agonistas parciales del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, aunque su efecto final sobre la transmisión de la serotonina, aunque no está demostrado en su totalidad.

La principal ventaja con respecto a las benzodiazepinas está planteada por una menor incidencia de efectos adversos. Puede producir cierta sensación de vértigo, mareo, cefalea, sudor, nerviosismo, inquietud, parestesias y náuseas, que pueden inducir el abandono del tratamiento por parte de los pacientes. La buspirona está se encuentra indicada particularmente en aquellos pacientes con antecedentes de abuso de alcohol, así también en pacientes en los que su trabajo suponga largos periodos de manejo de maquinaria o sean conductores profesionales, debido la disminución de las habilidades psicomotoras puede suponer un riesgo. (Flórez, 2014, pp. 543-565).

Además de los fármacos con acción predominante sobre los receptores GABA y 5-HT, se considera que otros transmisores y hormonas intervienen en las crisis de ansiedad, concretamente la noradrenalina, el factor liberador de corticotropina, el glutamato, la colecistocinina (CCK), el neuropéptido Y, la sustancia P, la galanina, las orexinas y los neuroesteroides. Por lo tanto se encuentran actualmente en estudio ansiolíticos específicos para estas dianas, aunque ninguno se halla disponible aún para su uso clínico (Rang & Dale, 2012, pp. 531-539).

En la actualidad con los avances en los estudios de nuevos fitofármacos para el tratamiento de ansiedad se encuentran disponibles nuevas líneas de tratamiento como lo es el tratamiento con extractos de *Passiflora edulis*, *Passiflora incarnata* o *Valeriana officinalis*, que han demostrado tener efectos comparables con los presentados por los fármacos empleados en los tratamientos

clásicos. (Cardoso, Soncini, & Giusti-Paiva, 2009, pp. 325-327 ) (Hernández, et.al, 2007) (Riofrío, 2014) (Li, et. al, 2011, pp. 185-190).

### **1.3.5. Modelos animales para el estudio de ansiedad**

Además del aspecto subjetivo o emocional de la ansiedad humana, existen parámetros ya antes mencionados como los efectos conductuales y psicológicos que también se presentan en animales de experimentación. En términos biológicos, el trastorno de ansiedad induce una forma particular de inhibición de la conducta, a causa de nuevos episodios o condiciones ambientales que generan episodios de amenaza y dolor. En los animales en dependencia de la raza y la respuesta a las situaciones de apremio, esta inhibición conductual puede presentarse como inmovilidad, búsqueda de lugares cerrados, o supresión de una respuesta conductual, como presionar una palanca para obtener alimento o soportar una carga eléctrica definida para obtenerlo (Rang & Dale, 2012, pp. 531-539).

La ansiedad ha sido estudiada ampliamente en modelos animales, algunos recurren a respuestas condicionadas, mientras otros modelos se caracterizan por el estudio de respuestas más naturales de la especie por lo tanto estos modelos son considerados etológicos o de respuestas no condicionadas (tabla 12-1). (Polanco & Vargas-Irwin, 2011, pp. 141-147)

#### **1.3.5.1. Modelos de respuesta condicionada**

Este tipo de modelos se fundamentan en la capacidad de respuesta ante un estímulo con la respuesta específica a otro estímulo. Comúnmente se presenta un estímulo de tipo aversivo, generalmente una descarga eléctrica sobre el animal quien debe manifestar una respuesta determinada. Estos tipos de modelos permiten al experimentador un control bastante preciso sobre los niveles de conducta basal.

El principal inconveniente de este tipo de modelos resulta de la necesidad casi permanente de entrenamiento de los sujetos de experimentación, también se requiere incluir en el diseño experimental varios grupos control, para descartar efectos no específicos del tratamiento sobre aspecto estrechamente relacionados con el estudio como: memoria, aprendizaje, apetito, percepciones motoras y somáticas. Existen dos variantes principales de este tipo d modelos:

- Modelos basados en el condicionamiento pavloviano o asociativo (comprende la supresión condicionada de presionar palanca y la denominada respuesta emocional condicionada (REC))

- Modelos basados en el condicionamiento instrumental o de operación, el cual implica un conflicto de aproximación-evitación, a este tipo se los denomina modelos de «**conflicto**».

El procedimiento clásico consiste en proporcionar una leve corriente eléctrica al animal a través de una base con rejillas metálicas en una caja de acondicionamiento. Este choque eléctrico o estímulo incondicionado (EI), comúnmente suele estar emparejado con un estímulo condicionado (EC), el cual puede ser el microambiente de la caja en la que se encuentre el animal, también pueden constituir otros (EC), estímulos auditivos o la luz. La presentación conjunta del EC-EI, resultará generalmente en que el EC elicit una respuesta condicionada (RC) en ausencia del estímulo incondicionado. La respuesta condicionada comúnmente estudiada es la inmovilización, que se define como la escasez de movimiento, excepto lo necesario para respirar; es así que la inmovilización es directamente proporcional al número de choques eléctricos que recibe el animal. Otras variables pueden influir en la inmovilización como lo es la cantidad de cambios entre los estímulos EC y EI y la sesión de observación, intervalos entre ensayos, la inhibición latente, número de ensayos condicionados, aumento de la intensidad de choque, tiempo entre intervalo entre ensayos, entre otras variables que puedan influir en el desarrollo del medio condicionado (Polanco & Vargas-Irwin, 2011, pp. 141-147).

### 1.3.5.2. Modelos de respuesta no condicionada

Este tipo de modelos se fundamentan en el estudio de la ansiedad valorando la respuesta fisiológica o conductual ante estímulos estresantes o nuevos para el animal. Con frecuencia se valora el miedo como respuesta ante situaciones novedosas, en donde el sujeto experimental es expuesto a espacios altos, abiertos o con luces brillantes. En este tipo de modelos el acceso a agua y alimento *ad libitum* es fundamental, no hay restricción de la corriente eléctrica en el transcurso del estudio y no se requiere de períodos extensos de entrenamiento (Polanco & Vargas-Irwin, 2011, pp. 141-147) (Cruz-Morales, et.al, 2003, pp. 93-105)

Los modelos representativos de los estudios de respuesta no condicionada son:

- ✓ Laberinto Elevado en Cruz o Elevated Plus-Maze (EPM siglas en inglés)
- ✓ Campo Abierto u Open Field Test (OF siglas en inglés)

Un ratón que es colocado conscientemente en un lugar de estudio que resulta ser nuevo para él, generalmente su respuesta es permanecer inmóvil pero alerta (supresión conductual) durante un tiempo determinado, el cual es una respuesta a la «ansiedad» mostrada por el animal producida por el entorno ajeno a su habitad habitual; el tiempo de inmovilidad suele disminuir con el

tiempo de manera normal, por un proceso de adaptabilidad. El reflejo natural de inmovilidad puede ser reducido con la administración de ansiolíticos. (Rang & Dale, 2012, pp. 531-539) (Polanco & Vargas-Irwin, 2011, pp. 141-147).

El laberinto en cruz-elevado es un modelo clásico ampliamente utilizado; dos brazos de la cruz elevada están abiertos y los otros dos se encuentran cerrados. Normalmente los animales de experimentación pasan más tiempo en las ramas cerradas que en las ramas abiertas (por miedo a caerse, inseguridad, o simplemente por miedo a quienes lo manipulan). La administración de fármacos con efecto ansiolítico incrementa el tiempo de permanencia de los animales de experimentación en los brazos abiertos y también el número de entradas en cualquiera de los brazos abiertos, pero sin incremento de la actividad motora (Rang & Dale, 2012, pp. 531-539).

El número de entradas en los brazos (generalmente se evalúa los brazos abiertos), se encuentra expresado en porcentaje o proporción de entradas en los brazos, el tiempo dedicado a los brazos, esta expresado en porcentaje o relación de tiempo en el brazo total (Polanco & Vargas-Irwin, 2011, pp. 141-147).

La menor frecuencia de entrada en los brazos abiertos es determinante de ansiedad, de manera que se considera que existe un mayor nivel de ansiedad cuando el sujeto experimental permanece más tiempo en los brazos cerrados (brazos más protegidos), con menor exploración en los brazos abiertos (potencialmente amenazadores) (Polanco & Vargas-Irwin, 2011, pp. 141-147).

Con el uso de nuevas tecnologías se han implementado monitorizaciones por videocámara y sistemas técnicos, mediante las cuales se han podido evaluar otras conductas como:

- Estiramiento del cuerpo
- Sumersión de la cabeza
- Estiramiento con soporte a la pared y
- retornar al brazo cerrado

También, se han incluido, las distribuciones espaciales de ciertas posturas o actos (como en sumergir la cabeza en relación a la estancia en el tipo de brazo, “protegido” o “no protegido”)

La modalidad de Campo abierto es una prueba elaborada por Hall (1934) que busca evaluar la respuesta de los sujetos ante un acontecimiento estresante. La emocionalidad en animales de experimentación es valorada mediante la frecuencia de la defecación y la orina al igual que la actividad conductual en el campo, en un área circular debidamente iluminada de aproximadamente de 1.2m de diámetro, la cual se encuentra cerrada por un muro de 0.45 m de altura. La prueba consiste en la valoración de parámetros conductuales que se producen en

respuesta al colocar un sujeto en un espacio abierto y completamente nuevo, en donde escapar no es posible. El animal es observado durante 2 a 20 minutos después de ser colocado en el centro o junto a las paredes del aparato, haciendo de esta modalidad una prueba fácil, sencilla y rápida de medir, igualmente los comportamientos a evaluar son fáciles de identificar y determinar (Polanco & Vargas-Irwin, 2011, pp. 141-147).

El comportamiento de ansiedad mostrado está determinado por dos aspectos fundamentales:

- La prueba individual (el animal es separado de un grupo social-propio) y
- la agorafobia (el campo es muy grande en relación al medio ambiente natural), se genera miedo a espacios abiertos en los que se ven obligados a estar.

Es importante destacar que el comportamiento de los roedores en el campo abierto depende primordialmente de los factores sensoriales táctiles. También hay que destacar que la exploración puede variar ante algunos factores como:

- Privación de alimento o agua
- Estado de la iluminación
- Olores fuertes
- Ruido, entre otros.

El principal inconveniente así como una gran preocupación constituye la falta de estandarización de los modelos no condicionados, en especial para las herramientas EPM y OF, debido a que los diferentes laboratorios, bioterios y demás relacionados usan formas y tamaños variados, de los modelos experimentales, es decir son adaptaciones del original, que presentan variaciones en la iluminación (zonas claras, opacas; con o sin iluminación), también pueden presentar una tapa en la parte superior, mientras en otros es abierto; también se puede dar la presencia de objetos en el campo y pueden variar los materiales con los que se fabrica el instrumento (aún no se sabe cómo puede influir el material en el estudio) (Polanco & Vargas-Irwin, 2011, pp. 141-147).

**Tabla 12-1.** Compendio de las pruebas de mayor uso para evaluar la ansiedad en animales de experimentación.

MODELOS DE RESPUESTA INCONDICIONADA	MODELOS DE RESPUESTA CONDICIONADA
Campo abierto	Respuesta emocional condicionada
Tabla de agujeros	Supresión condicionada
Caja de dos compartimientos blanco-negro	Evitación pasiva/activa
Laberinto elevado en cruz	Prueba de cuatro platos
Interacción social	Test de conflicto de Geller-Seifter y el de Vogel
Supresión de la ingesta inducida por la novedad	Condicionamiento de vocalizaciones ultrasónicas
Contraste negativo	Estimulación eléctrica cerebral
Conducta defensiva de enterramiento	Modelo de Thiébot de retirada de la señal de seguridad
Holeboard	Efecto del reforzamiento parcial sobre la extinción
	Potenciación de la respuesta de sobresalto

**Fuente:** (Polanco & Vargas-Irwin, 2011)

### 1.3.6. Canayuyo (*Sonchus oleraceus*)

#### 1.3.6.1. Clasificación taxonómica

En la tabla siguiente se presenta la clasificación taxonómica del Canayuyo, extraído de tesis pasadas de estudiantes de la ESPOCH y la UTA.

**Tabla 13-1.** Clasificación taxonómica del Canayuyo.

<i>Reino</i>	Plantae
<i>División</i>	Magnoliophyta
<i>Clase</i>	Magnoliopsida
<i>Orden</i>	Asterales
<i>Familia</i>	Asteraceae
<i>Género</i>	Sonchus
<i>Especie</i>	Oleraceus

**Fuente:** (Torres, 2012)

**Elaborado por:** (Orna, 2015)



**Figura 14-1.** *Sonchus oleraceus* L. ilustración botánica.  
**Fuente:** (Freckmann, 2012)

### 1.3.6.2. Nombres populares

- **Español:** cerraja, lehecillo, lechuguilla, canapaco (Bolivia), hierba de cuy (Ecuador), plumillo
- **Inglés:** sowthistle.
- **Portugués:** serralha, leitaruga.
- **Otros:** lactucella (Italiano), qarasaoui (Quechua), rauriki (Maorí), llamp'u (Aymará), nilhue (Mapuche). (Torres, 2012, p. 34)

### 1.3.6.3. Historia

La denominación del género «*Sonchus*» provendría aparentemente del latín y sería el nombre asignado por Teofrasto a esta planta debido a la similitud con el cardo. Para otros científicos el término provendría del griego cuyo significado es «hueco», en referencia al espacio hueco del tallo. En tanto que «*oleraceus*» tendría relación con su carácter perfumado. Dioscórides en la antigüedad le designaría el nombre de Sonco, y esta sería recomendada para estimular la secreción de leche y para dolores de estómago. En Italia es denominada “lactucella” debido a la secreción de látex lechoso que emana la planta después de un corte. De acuerdo con escritos de Gerónimo de Bibar en 1558, sobre la flora chilena se piensa que este género fue introducido en



América en los primeros años de la conquista. También existen referencias acerca de que el navegante inglés J. Cook llevaba consigo esta planta en sus navíos con la finalidad de evitar el escorbuto. (Torres, 2012, pp. 34)

Canayuyo (*Sonchus oleraceus*) (fig. 15-1), es una especie perenne con flor herbácea, perteneciente a la familia de las Compuestas (Asteraceae). Puede llegar a medir hasta 1.5 m de altura, pero su tamaño normal se sitúa entre 40-90cm. El tallo es cilíndrico, hueco por dentro y se caracteriza por la presencia de una sustancia lechosa en su interior.

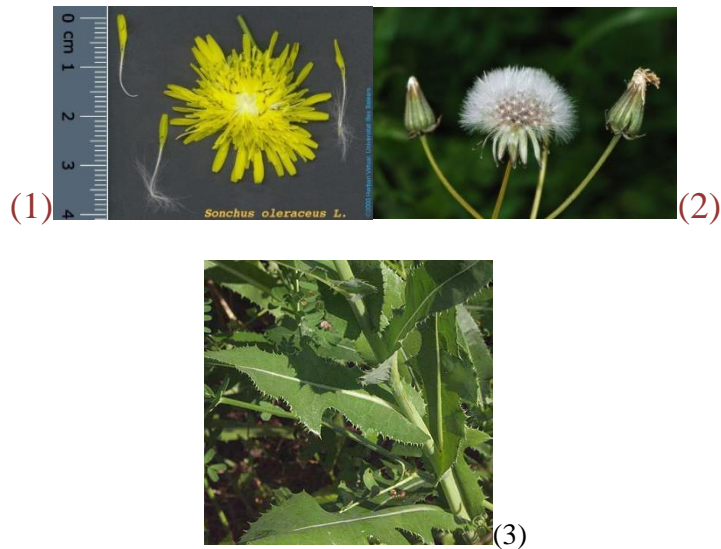
Las hojas son de naturaleza alterna, runcinadas y las inferiores poseen lóbulos dentados, y las superiores son sésiles, auriculadas en la base; se encuentran divididas en segmentos y tienen los bordes dentados; en la base se distingue una formación de dos gajos triangulares que abrazan el tallo.

Las flores son de color amarillo, liguladas, se encuentran agrupadas en ramilletes de cuatro o cinco, estas se agrupan en cimas unbeliformes, con involucre de tipo acampanado de 10-12 mm de alto. Los frutos de color pardusco, son muy pequeños y tienen la piel con numerosas arrugas bastante finas; algunos autores lo describen como un aquenio lanceolado, comprimido, glabro, de 3,5 mm de largo. El Canayuyo florece en verano y fructifica en época de otoño (Freckmann, 2012) (Linnaeus, 1753, pp. 794)

#### **1.3.6.4. Descripción Botánica**

Canayuyo (*Sonchus oleraceus*) (Véase figura 15-1), es una especie perenne con flor herbácea, perteneciente a la familia de las Compuestas (Asteraceae). Puede llegar a medir hasta 1.5 m de altura, pero su tamaño normal se sitúa entre 40-90cm. El tallo es cilíndrico, hueco por dentro y se caracteriza por la presencia de una sustancia lechosa en su interior. Las hojas son de naturaleza alterna, runcinadas y las inferiores poseen lóbulos dentados, y las superiores son sésiles, auriculadas en la base; se encuentran divididas en segmentos y tienen los bordes dentados; en la base se distingue una formación de dos gajos triangulares que abrazan el tallo.

Las flores son de color amarillo, liguladas, se encuentran agrupadas en ramilletes de cuatro o cinco, estas se agrupan en cimas unbeliformes, con involucre de tipo acampanado de 10-12 mm de alto. Los frutos de color pardusco, son muy pequeños y tienen la piel con numerosas arrugas bastante finas; algunos autores lo describen como un aquenio lanceolado, comprimido, glabro, de 3,5 mm de largo. El Canayuyo florece en verano y fructifica en época de otoño (Freckmann, 2012) (Torres, 2012, p. 34) (Linnaeus, 1753, p. 794)



**Figura 15-1.** Partes del Canayuyo (1) flor, (2) fruto característico blanquecino y (3) hojas típicas dentadas  
**Fuente:** (Torres, 2012, p. 34).

#### 1.3.6.5. *Hábitat*

El canayuyo es una especie de origen europeo, norafricano y del oeste asiático. En la actualidad es adventicia en todo el planeta. Crece prevalentemente en terrenos de zonas templadas, entre los 760 y 1880 metros s.n.m (Torres, 2012, p. 34).

#### 1.3.6.6. *Parte utilizada*

La mayor cantidad de información sitúa al uso de esta planta como alimento para animales e incluso para consumo humano en las ensaladas. Pocos son los reportes del uso del canayuyo con fines curativos, es así que la mayor cantidad de datos sujetan la hipótesis de la utilidad de las partes aéreas del canayuyo principalmente como: laxante, diurético, depurativo, antiinflamatorio, antioxidante y tónico general (Cardoso, Soncini, & Giusti-Paiva, 2009, pp. 325-327 ) (Linnaeus, 1753, p. 794) (Garcés, 2012, pp. 40-42). En Europa se emplea con frecuencia la parte aérea mientras en Sudamérica se emplea preferentemente la planta entera, incluyendo el látex (Torres, 2012, p. 34).

### 1.3.6.7. Composición química

En la planta se han aislado y caracterizado principalmente flavonoides del tipo:

- Apigenina
- Apigenina-7-glucosido
- apigenina-7-O- $\beta$ -D-glucuronido metil éster
- apigenin-7-O- $\beta$ -D-glucuronide etil éster
- apigenin-7-O- $\beta$ -D-glucopirauronido
- luteolina
- luteolina-7-O- $\beta$ -D-glucósido (Xu & Liang, 2005, pp. 7); otros autores establecen la presencia del compuesto quercetin-3-glucósido (Giner, Et. Al, 1993, pp. 617-620).

También están presentes ácidos fenólicos como el ácido cafeico, ácido clorogénico y ácido isoclorogénico (Giner, Ubeda, Just, Serrano, & Ángel., 1993, pp. 617-620); triterpenos como el caso del ácido oleanólico; un eudesmanólido (sesquiterpenlactona) de estructura (3 $\beta$ -hydroxy-6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,11 $\beta$ -H-eudesm-4-en-6,12-olide) y por último también se describe la presencia de 1-cerotol, un compuesto del cual se tiene muy poca información (Xu & Liang, 2005, pp. 7).

El látex contenido principalmente en el espacio hueco del tallo y en el fruto, puede contener fitosterina, aunque existe poca información sobre la presencia de este compuesto en esta especie vegetal (Torres, 2012, p. 34).

### 1.3.6.8. Acciones farmacológicas

Si bien el canayuyo es una especie ampliamente extendida en todo el mundo, hasta la fecha no se ha oficializado líneas de tratamientos completamente eficaces y los estudios en la actualidad muestran una amplia variedad de efectos farmacológicos como ya se mencionó anteriormente. Existe las bases científicas suficientes para definir varias de las propiedades farmacológicas de esta planta, las principales acciones farmacológicas son:

- Antioxidante (debido al alto contenido de polifenoles, se considera que su acción antioxidante es comparable a los extractos de frutos de arándanos) (McDowell, Thompson, Stark, ZQ, & Gould, 2011, pp. 1876-1882)
- Actividad antiinflamatoria-antipirética: se ha demostrado que una dosis de 300mg/kg p.o. de extracto de SoHE tiene un efecto antiinflamatorio mayor al de indometacina (10mg/kg) o dexametasona (1 mg/kg), corroborando el uso tradicional como antiinflamatorio (Vilela, y otros, 2010, pp. 737-741)

### 1.3.7. *Mus musculus*

#### 1.3.7.1. Clasificación taxonómica

En la tabla siguiente se presenta la clasificación taxonómica del ratón de laboratorio.

**Tabla 14-1.** Clasificación taxonómica del ratón (*Mus musculus*).

<i>Clase</i>	Mammalia
<i>Familia</i>	Muridae
<i>Género</i>	Mus
<i>Especie</i>	<i>Mus musculus</i>

**Fuente:** (Ministerio Nacional de Salud de Perú, 2008)  
Elaborado por: (Orna, 2015)

#### 1.3.7.2. Características generales

El ratón es un múrido, mamífero de sangre caliente, presenta hábitos nocturnos y la naturaleza de su comportamiento está influenciado por feromonas. Por su diminuto tamaño esta especie es muy susceptible a cambios ambientales, debido a que una variación de la temperatura en el rango de 2 a 3°C, puede modificar su fisiología por cambios en la temperatura corporal.

El tamaño del ratón en su etapa adulta oscila entre 12 a 15 cm desde la punta de la cola a la punta de la nariz; la longitud de la cola es igual a la longitud del cuerpo y con un peso aproximado de 30 gr. Después del parto las crías tienen un peso aproximado que oscila entre 1 a 2 g, con un aumento considerable de peso durante la lactancia. El ratón de laboratorio es una especie de naturaleza cosmopolita, se adapta a una gran variedad de condiciones ambientales, desde zonas tropicales a regiones muy frías, con preferencia por las zonas secas. (Ministerio Nacional de Salud de Perú, 2008)

Dentro de sus características de los sentidos destaca un agudo sentido auditivo, así también su sentido del olfato está muy desarrollado, no sólo para identificar precozmente comida y depredadores, sino también para percibir el orden social de su ambiente.

Su visión en cambio es muy pobre, no pudiendo percibir los colores. Alrededor de la órbita del ojo se encuentran unas glándulas con forma de herradura denominadas glándulas Harderianas,

responsables de la excreción de porfirina (sustancia de color marrón), excretada ante situaciones de premura o estrés (Ministerio Nacional de Salud de Perú, 2008).

El sistema social va a estar en dependencia de la densidad de poblacional, presentan un rango social bien desarrollado por lo que son aptos modelos para determinaciones in vivo para evaluaciones de trastornos sociales y cognitivos. Comúnmente son muy dóciles, con excepción de algunas cepas sobre las cuales no se tenga estricto control en su cría, a las cuales se les denomina «exocriadas» y se caracterizan por mantener su agresividad, al igual que sus antecesores salvajes (Ministerio Nacional de Salud de Perú, 2008)

### **1.3.7.3. *Comportamiento***

El ratón es un animal naturalmente sociable, que se mantiene en grupos sin ningún problema. Algunas cepas de machos comienzan a mostrar su agresividad entre la séptima y décima semana de edad, a pesar de que los grupos se hayan establecido justo después del destete. En el grupo de machos existe uno dominante que puede ser muy agresivo. Incidentes de peleas no se registran con frecuencia en hembras, inclusive cuando se hayan agrupado en una misma jaula en la edad adulta.

El acto de alimentación es cíclico y presenta un pico máximo durante el periodo de oscuridad, así también el mayor consumo de agua se registra en la oscuridad. El ratón comúnmente divide su caja en áreas específicas para comer, dormir, orinar y defecar. Las hembras previo al parto construyen un nido en el cual permanecen mucho tiempo para el cuidado de sus crías.

## **CAPITULO II**

### **2. MARCO METODOLÓGICO**

El protocolo general en el cual se basó la secuencia del estudio se muestra en la Figura 1-2, en el cual se puede apreciar a grandes rasgos los procesos de análisis cualitativo, análisis espectral de identificación y cuantificación, cuantificación HPLC y el análisis farmacológico que comprende la evaluación de la actividad ansiolítica y la evaluación de la actividad del extracto sobre los receptores GABA mediante el uso de un agonista inverso.

#### **2.1. Lugar de investigación**

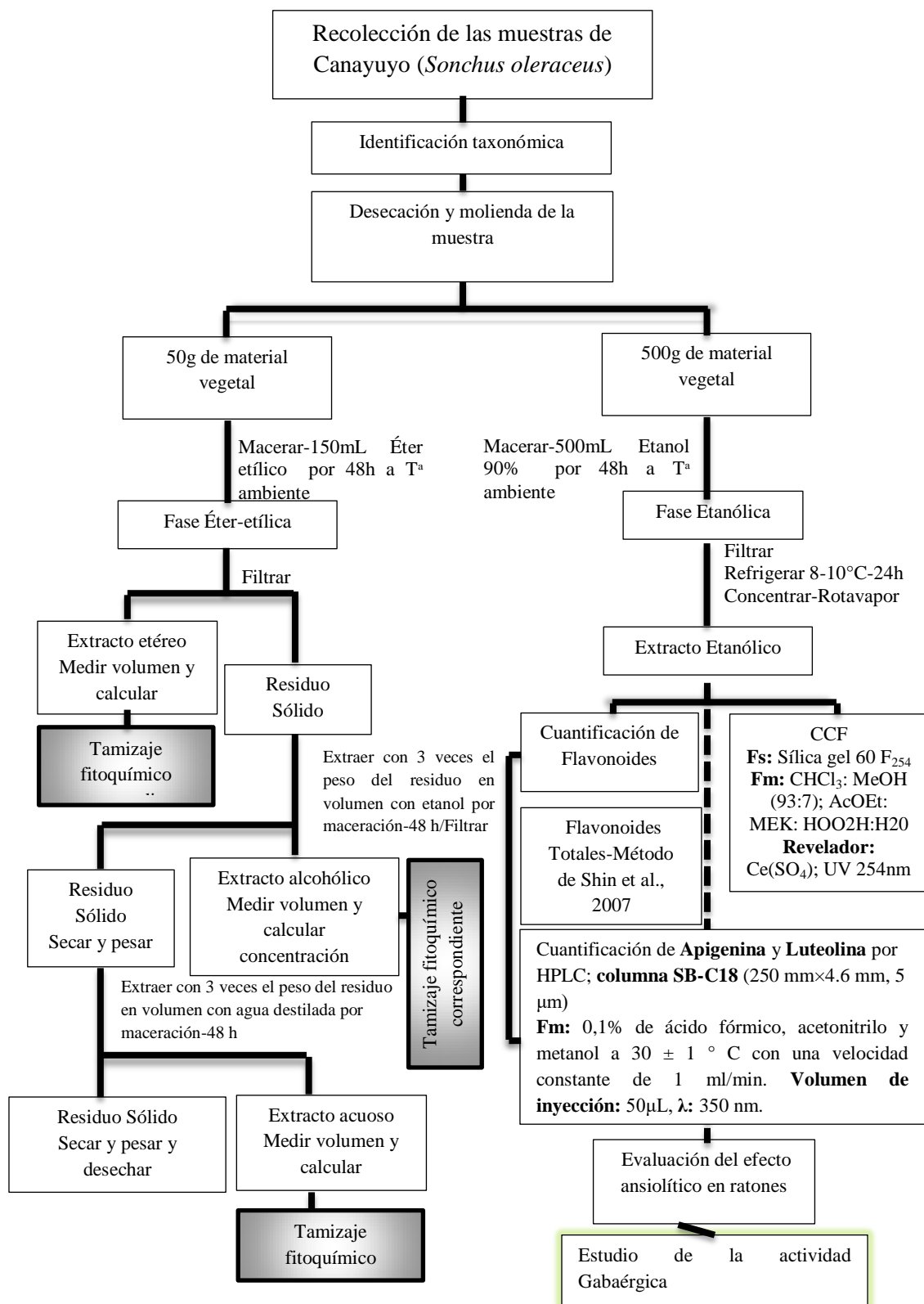
El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Productos Naturales y en el Bioterio de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

#### **2.2. Recolección del Material vegetal**

El material vegetal se fue recogido en el barrio Puerto Arturo de la Parroquia Unamuncho de la provincia de Tungurahua en las coordenadas GPS: -1.22765, -78.58667

#### **2.3. Identificación botánica**

Se tomaron 5 muestras diferentes del material vegetal las cuales fueron prensadas y entregadas en el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo a cargo del Ing. Jorge Caranqui.



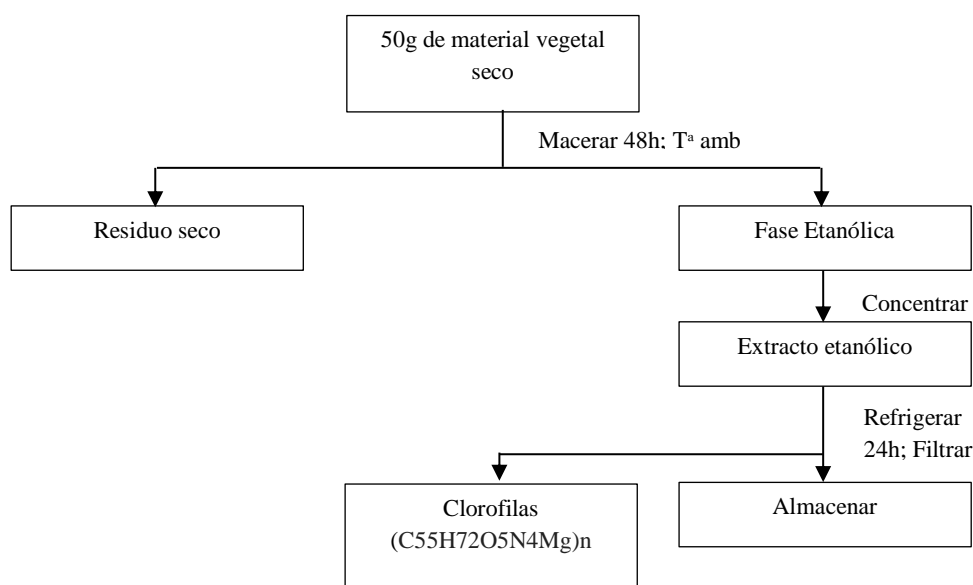
**Figura 1-2.** Metodología experimental para la investigación del proyecto de titulación.  
Elaborado por: (Orna, 2015)

## 2.4. Secado y molienda

La planta fresca (tallos, hojas y flores) es desecada en una estufa de aire caliente marca memmert a una temperatura de 40°C. Una vez se determina que toda la muestra vegetal está seca es molida y enfundada en un sobre de papel rígido para evitar la ganancia de humedad.

## 2.5. Elaboración del extracto

Teniendo en cuenta la solubilidad de los diferentes flavonoides de estudio, tanto agliconas como glicósidos se elabora un extracto hidroalcohólico mediante la maceración en frío durante 48h con agitaciones reiteradas de la solución., posteriormente se filtra la solución y se determina el rendimiento mediante gravimetría del extracto seco; la fase etanólica se concentra en Rotavapor hasta 1/3 del volumen total, finalmente se precipita las clorofilas mediante la refrigeración (0-8°C) durante 24h, tiempo después se obtiene un extracto clarificado de tonalidad amarillenta.



**Figura 2-2.** Proceso de elaboración del extracto etanólico de *Sonchus oleraceus*.

Elaborado por: (Orna, 2015)

## 2.6. Métodos físico-químicos aplicados al análisis de drogas crudas. Parámetros de control de la calidad

Los métodos físico químicos de análisis son fundamentales para evaluar la calidad de una droga, así también como sustento de identificación de especies vegetales.

El análisis físico-químico de una muestra seca pretende diferentes métodos de análisis, varios de los cuales se describen a continuación.



### **2.6.1. *Determinación del contenido de humedad***

La presencia de un elevado contenido de agua en las drogas vegetales, puede conducir a un mayor riesgo de contaminación microbiana, así como la hidrólisis de constituyentes que pueden provocar el deterioro de la droga. Debido a esta consideración es fundamental la determinación del contenido de agua en drogas vegetales, como indicador de estabilidad de los constituyentes químicos, especialmente para aquellas especies vegetales con elevado contenido de agua o aquellas muestras que absorben fácilmente la humedad.

Los límites de agua usualmente establecidos en las farmacopeas oscilan entre 8 a 14% con pocas discrepancias entre ellas, aunque de manera general una droga vegetal debe contener un contenido de humedad menor a 10% (Villar, 1994, p. 72). Los métodos más usados para determinar el contenido de humedad en las drogas vegetales son el gravimétrico (pérdida por desecación) y el azeotrópico (destilación con tolueno).

El método gravimétrico es el más sencillo, pero no es factible con drogas que contengan sustancias volátiles. El método azeotrópico es de gran utilidad para el análisis de drogas compuestas por sustancias volátiles, su mayor inconveniente es el requerimiento de un equipo especial (Villar, 1994, p. 72).

### **2.6.2. *Determinación de cenizas totales***

Las cenizas totales representan el contenido total de minerales de la muestra de estudio, se trata de todo el residuo inorgánico que queda tras eliminar completamente los compuestos orgánicos presentes en la muestra, si bien es importante considerar que en el residuo incinerado no se encuentran los mismos elementos que en la muestra inicial que se encontrase intacta, debido a pérdidas de volatilización e interacción o conversión entre los constituyentes químicos. (Española, Real Farmacopea, 2003, p. 95)

El método se fundamenta en la destrucción de la materia orgánica presente en la muestra seca por calcinación y posterior determinación gravimétrica del residuo.

### **2.6.2.1. Metodología experimental**

Para el ensayo se pesa una cantidad de muestra pulverizada y tamizada de no menos de 2,0g, hasta no más de 3,0 g con una desviación permisible de 0.5mg en un crisol de porcelana o platino (en dependencia de la sustancia analizada) previamente tarado. La porción de ensayo debe ser calentada suavemente en campana de gases hasta ser totalmente carbonizada, posteriormente la muestra se incinera en horno mufla a una temperatura de 700-750°C, si no se señala una temperatura específica en la norma correspondiente, durante un tiempo no menor a 2h.

El crisol es retirado de la mufla y se enfría en una desecadora, se pesa, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0.5mg por g (masa constante). Para alcanzar la masa constante los intervalos entre incineración y pesaje son de 30min. Si el residuo obtenido de la incineración presentase trazas de carbón, se procede a añadir unas gotas de solución de peróxido de hidrógeno concentrado, solución de nitrato de amonio al 10% m/v o ácido nítrico, posteriormente se calienta la muestra hasta evaporar los solventes. Al enfriar el crisol el residuo debe presentarse de color blanco o casi blanco.

### **2.6.2.2. Expresión de resultados**

Los resultados son expresados en % de Cenizas totales en función de la siguiente formula:

$$\% C = \frac{(m_2 - m)}{(m_1 - m)} * 100$$

Donde:

- %C: porcentaje de cenizas totales
- m<sub>2</sub>: masa en gramos de la cápsula con las cenizas
- m<sub>1</sub>: masa en gramos de la cápsula con la muestra seca
- m: masa en gramos de la cápsula vacía

### **2.6.3. Cenizas Solubles en agua**

La finalidad del método consiste en evaluar la cantidad de material inorgánico soluble en agua presente en las cenizas totales.

### **2.6.3.1. Metodología Experimental**

A las cenizas totales obtenidas, se le añaden un volumen 15 a 20 mL de agua destilada libre de material mineral. El crisol se tapa y mientras la solución hierve suavemente a la llama del mechero durante 5min. Se deja enfriar la solución y se filtra a través un filtro libre de cenizas. El filtro con el residuo se transfiere al crisol inicial, se carboniza con mechero en cámara de gases, previa la incineración en un horno mufla de 700-750°C, por un tiempo no menor a 2h. El crisol es retirado de la mufla y se enfría en una desecadora, cuando el crisol alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta alcanzar peso constante.

### **2.6.3.2. Expresión de resultados**

Los resultados son expresados en % de Cenizas totales solubles en agua, en función de la siguiente formula:

$$\%Ca = \frac{(m2 - ma)}{(m1 - m)} * 100$$

Donde:

- Ca: porcentaje de cenizas solubles en agua
- m2: masa en gramos de la cápsula con las cenizas totales
- m1: masa en gramos de la cápsula con la muestra seca
- ma: masa del crisol con las cenizas insolubles en agua
- m: masa en gramos de la cápsula vacía

### **2.6.4. Cenizas insolubles en ácido clorhídrico**

Este método determina el contenido de sustancias minerales insolubles en ácido clorhídrico contenido en una muestra vegetal. Las cenizas insolubles en ácido son una medida de la materia arenosa y en las regulaciones de EUA se prescribe el máximo para hierbas y especias.

#### 2.6.4.1. Metodología experimental

A las cenizas totales obtenidas, se le añade un volumen de 2-3 mL de ácido clorhídrico al 10%. El crisol se tapa herméticamente con un vidrio reloj y se calienta sobre un baño de agua hirviendo durante 10 min. El vidrio reloj debe ser lavado cuidadosamente con 5mL de agua destilada caliente y este lavado se deposita junto con el contenido del crisol.

La solución se filtra a través de un filtro libre de cenizas; se lava el residuo con agua destilada caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido nítrico p.a; al cual se le añade una o dos gotas de solución de nitrato de plata 0.1mol/L, no presente rastro de cloruros.

El filtrado con el residuo se deseca a una temperatura de 100 a 105°C, se transfiere el contenido al crisol inicial y se incinera en un horno mufla a una temperatura de 700-750°C por un tiempo no menor a 2h (si no se señala otra temperatura en la norma específica). El crisol es retirado de la mufla y se enfría en una desecadora, cuando el crisol alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta alcanzar peso constante

#### 2.6.4.2. Expresión de resultados

Los resultados son expresados en % de Cenizas totales insolubles en ácido clorhídrico, en función de la siguiente formula:

$$\%Cia = \frac{(m2 - m)}{(m1 - m)} * 100$$

Donde:

- % Cia: porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico
- m2: masa en gramos de la cápsula con las cenizas totales
- m1: masa en gramos de la cápsula con la muestra seca
- m: masa en gramos de la cápsula vacía

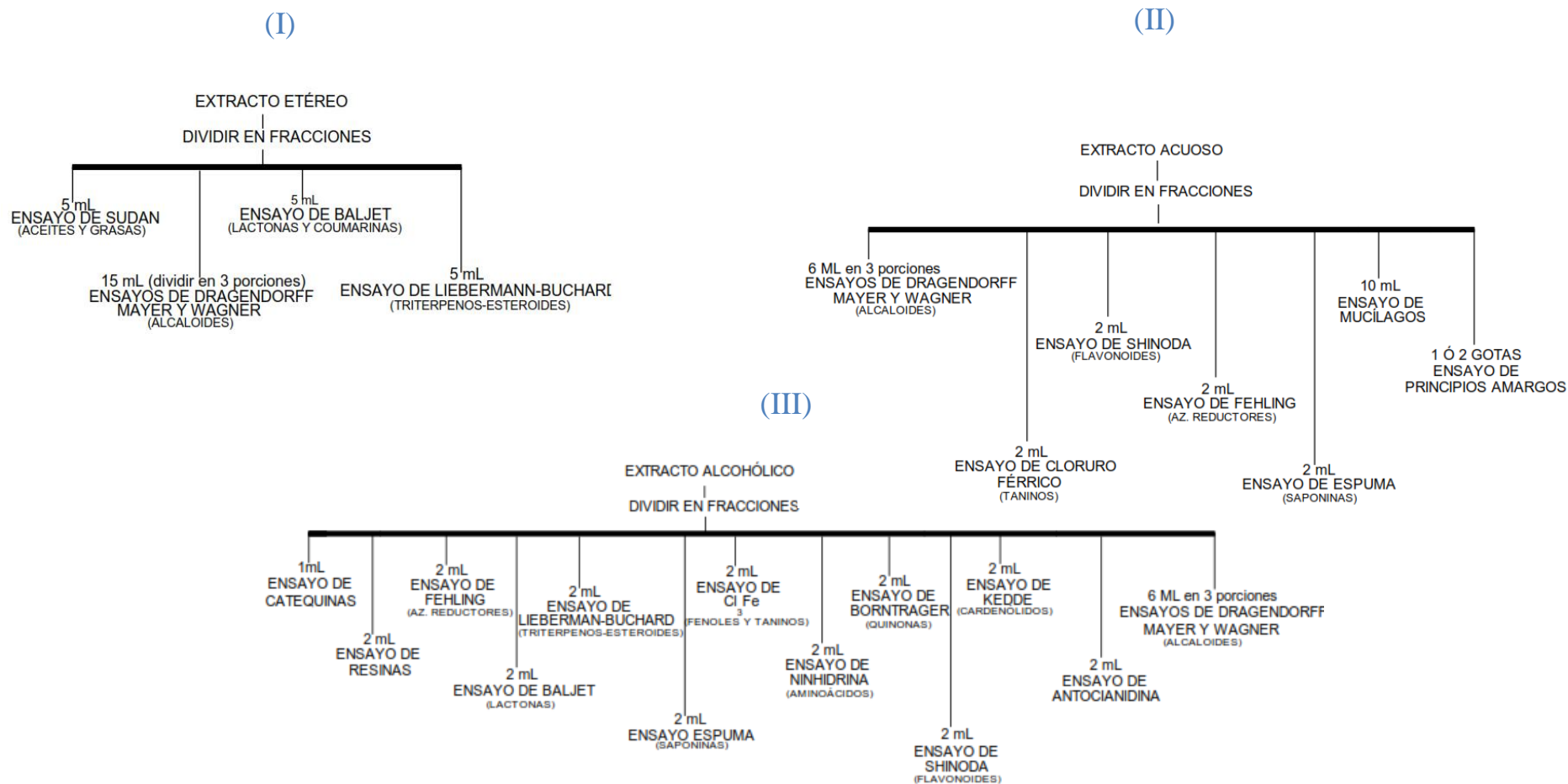
## **2.7. Análisis Cualitativo**

El análisis químico cualitativo consiste en técnicas de "screening" (tamizaje), que contribuyen en la identificación de metabolitos primarios y secundarios de interés fitoquímico, principalmente mediante reacciones de coloración y de precipitados.

Las reacciones se caracterizan por su alta selectividad para clases o grupos de compuestos que químicos, son sencillas y rápidas, detectan mínimas cantidades presentes y utilizan un mínimo de recursos instrumentales de laboratorio.

Debe considerarse que resultados negativos pueden deberse a la ausencia de la clase de compuestos buscada en la muestra de estudio, así como la selección errónea del solvente de extracción, presencia de sustancias extrañas que pueden dar como resultado falsos positivos o falsos negativos.

La selección del disolvente, para una extracción fraccionada de compuestos en función de la polaridad, da lugar a diferentes esquemas de trabajo para el screening fitoquímico. Todas las reacciones de identificación se realizaron en base a las normas RAMANES (fig. 3-2; (I) metodología a ensayar en el extracto etéreo; (II) metodología a ensayar en el extracto acuoso; (III) Metodología a ensayar en el extracto alcohólico).



**Figura 3-2.** Esquema del screening fitoquímico correspondiente a los extractos etéreo, acuoso y alcohólico  
Fuente: Normas Ramanes

## 2.8. Análisis TLC

Con la finalidad de identificar flavonoides con posible actividad ansiolítica, se realiza una serie de estudios cromatográficos en capa fina basados en el estudio “Contribución al conocimiento de la composición polifenólica de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* y *E. rudis*”.

La fase estacionaria comprende silica gel 60, mientras que para la elección de la fase móvil se utilizaron una serie de fases móviles, Cloroformo:metanol (93:7), AcEt:MBK:CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (50:30:10:10), CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (65:45:12) y CHCl<sub>3</sub>:HOAc:H<sub>2</sub>O (95:5:5); presentando la mejor eficacia, eficiencia y resolución la Fm AcEt:MBK:CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (50:30:10:10).

## 2.9. Análisis espectral y Cuantificación de Flavonoides totales

El análisis espectral constituye la identificación de los flavonoides de interés, mediante la utilización de reactivos de desplazamiento. Con esta finalidad se realiza una cromatografía en capa fina preparativa con Fm: AcEt:MBK:CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O en proporciones (50:30:10:10). Posteriormente los compuestos son aislados y recogidos en etanol caliente, el análisis espectral comienza con un barrido a una  $\lambda=200-500$  nm de la muestra en etanol; se forman dos grupos de estudio para el análisis de desplazamientos espectrales; al primer grupo se añade 100  $\mu$ L de AlCl<sub>3</sub> 10% (w/v) como reactivo de desplazamiento y al segundo se añade además del mismo volumen de AlCl<sub>3</sub>, 100  $\mu$ L de una solución 1 mol/L de acetato de potasio, basado en el estudio “A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids” elaborado por Denni & Mamment en el año 2012

Para la cuantificación de flavonoides totales encontrados en la especie *Sonchus oleraceus* se sigue la metodología de Kostennikova Z. modificada para el presente estudio, para la cual se procede la hidrólisis de una alícuota de extracto con un volumen igual de solución de HCl 2N en etanol al 96% sometida a reflujo durante 2h, luego se enfría y filtra con ayuda de vacío.

El residuo se lava con 30 mL de etanol al 60% para desecharlo finalmente.

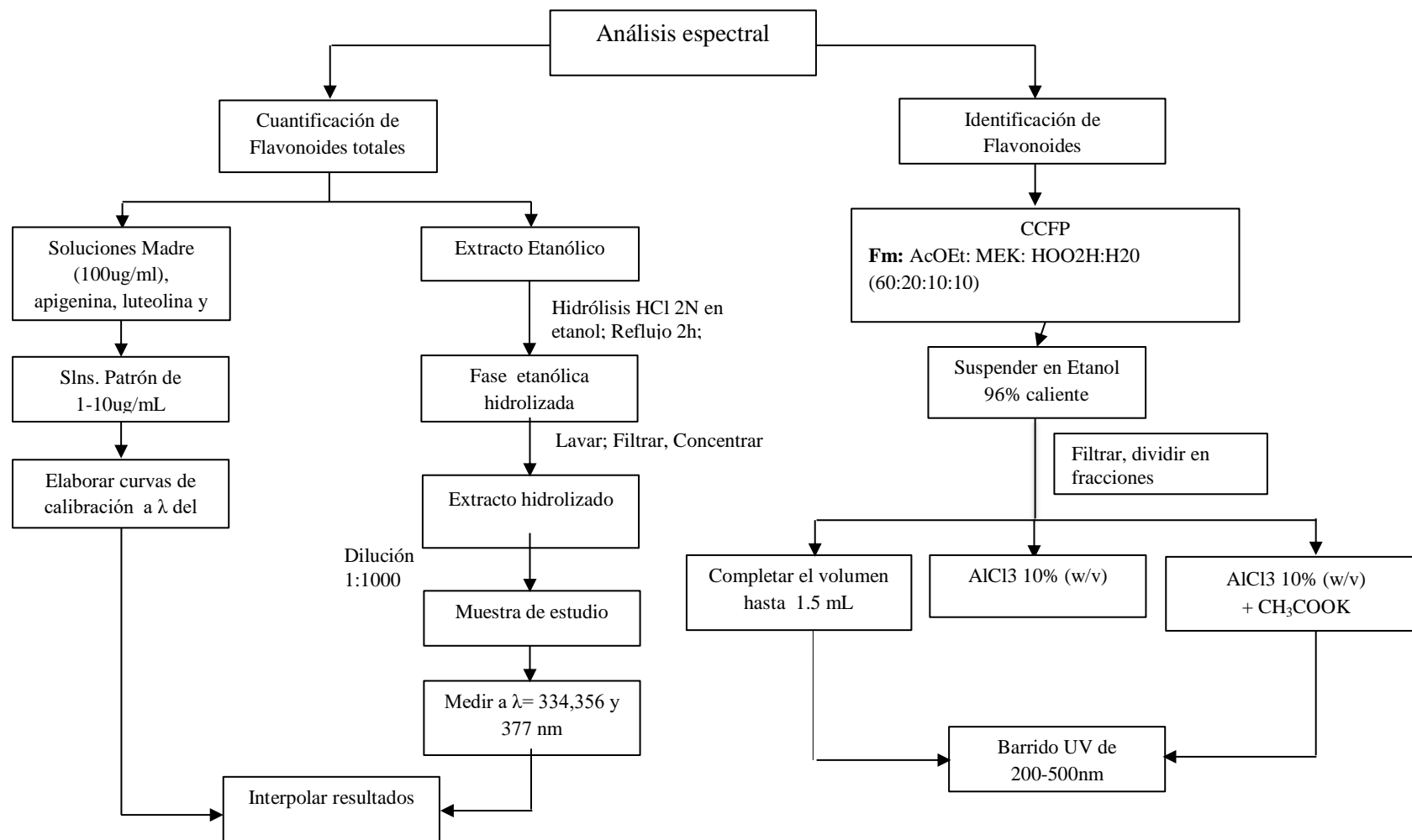
El filtrado total obtenido se concentra en Rotavapor hasta la mitad del volumen inicial, constituyendo la muestra de trabajo que va a ser estudiada a tres longitudes de onda fija, correspondientes a las longitudes de onda máximas para el pico I de apigenina, luteolina y quercetina respectivamente obtenidas de la absorción presentada por el anillo B de las estructuras flavonoides.

Los estándares para el análisis UV, luteolina, apigenina (pureza >98%) y quercetina (pureza >96%) fueron adquiridas de Shaanxi Huike Botanical Development Co., Ltd.

A partir de estos estándares se elabora una solución madre de 100ug/mL de cada uno de los flavonoides disuelto en etanol caliente al 96%, a partir de la cual se elaboran soluciones patrón de 1, 2.5, 5, 7.5 y 10 ug/mL. Se elaboran barridos inteligentes con las soluciones de 5ug/mL y 10ug/mL de cada compuesto y posteriormente se elabora una curva de calibración con el resultado de las absorbancias de las cinco soluciones patrón medidas a las longitudes de onda correspondientes al pico I de cada compuesto respectivamente.

Finalmente la muestra hidrolizada es diluida en 100 partes para la medición a las diferentes longitudes de onda fija determinadas con anterioridad, las mediciones se realizan por triplicado y el resultado promedio es interpolado en cada una de las curvas de calibración obtenidas. El resultado es expresado como ug equivalentes/mL de apigenina; luteolina y quercetina respectivamente.





**Figura 4-2.** Análisis espectral para la identificación de Flavonoides y su cuantificación.  
 Elaborado por: (Orna, 2015)

## **2.10. Análisis HPLC**

El análisis HPLC se realiza en una columna Pelco LC-18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) con una fase móvil ácido fórmico: acetonitrilo: metanol (60:16:24) a 35±1°C con un flujo de 1.3mL/min. El volumen de inyección utilizado es 10 µL, a una longitud de onda de 350 nm para el análisis cuantitativo, la proporción de los componentes de la fase móvil es tomada del estudio realizado por Chen, Kong, Song, Li &Jiang, Huidi en el año 2012. Los reactivos empleados, tanto ácido fórmico y metanol tienen grado ACS, mientras el reactivo acetonitrilo es grado HPLC.

### **2.10.1. Preparación de las soluciones de trabajo**

Las soluciones patrón de apigenina y luteolina (aproximadamente 0.5mg/mL) y de estándar interno, quercetina (aproximadamente 1mg/mL) son preparadas disolviendo las cantidades pertinentes de las referencias en metanol, respectivamente.

A partir de la solución madre se elabora soluciones patrón de 5ug/mL para apigenina y luteolina y de 10ug/mL para el estándar interno, quercetina.

### **2.10.2. Preparación de la muestra problema**

La muestra de trabajo consiste en el extracto hidrolizado preparado con anterioridad, cuya preparación se mencionó en el apartado correspondiente a la cuantificación de flavonoides totales. A partir de este extracto se realiza una dilución 1:10 con metanol ACS grado USP para su análisis.

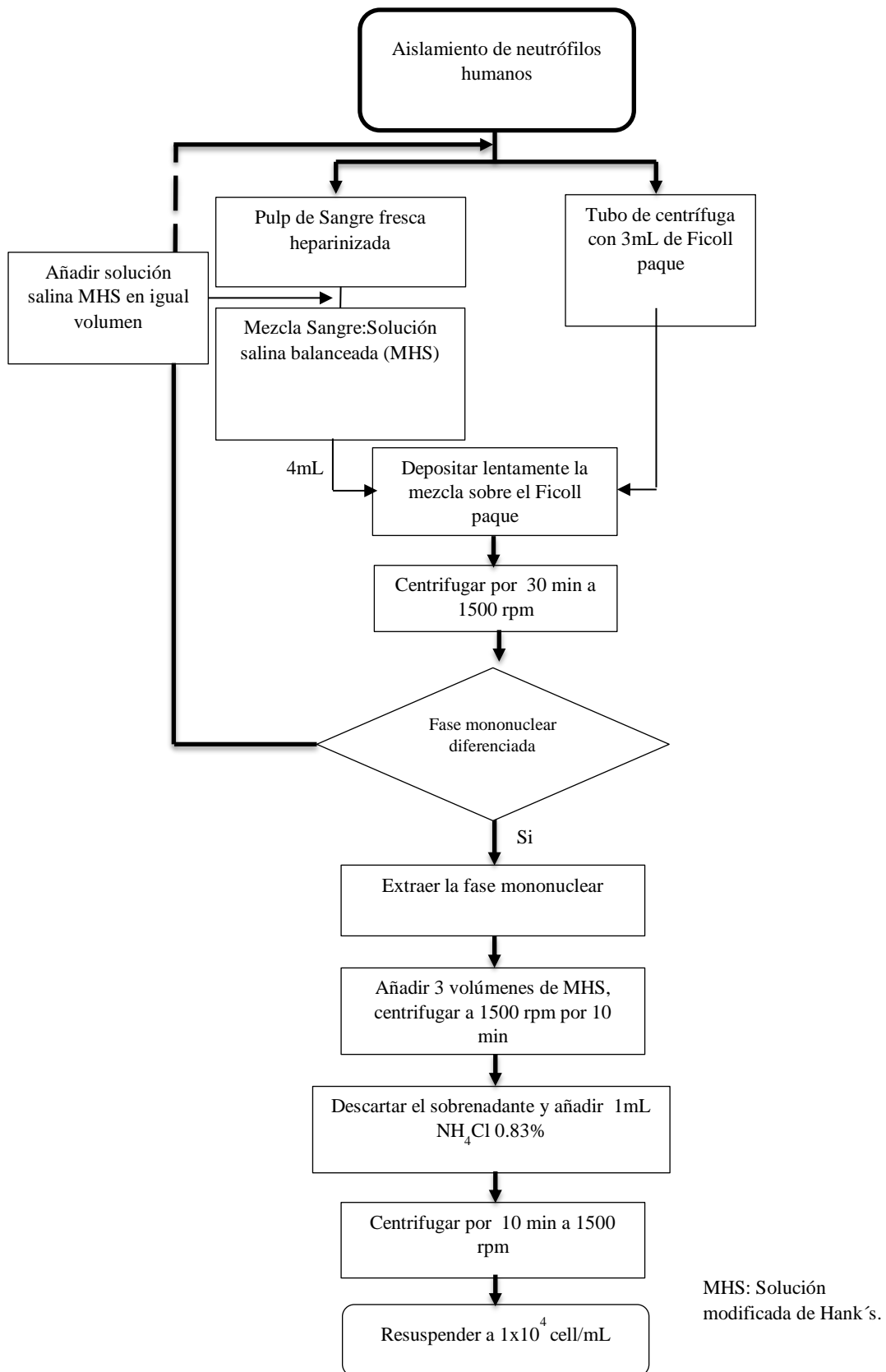
## **2.11. Evaluación de la actividad citotóxica**

Las células vivas (metabólicamente activas) son capaces de reducir las sales de tetrazolio para formar compuestos denominados formazan, caracterizados por un color específico en función de la sal de tetrazolio. Los ensayos colorimétricos basados en el uso de sales de tetrazolio se fundamentan en la detección de células viables exclusivamente.

Estos ensayos sensibles pueden ser realizados en una placa de micropocillos (MTP) con un número relativamente pequeño de células mediante la utilización del método modificado de Berridge et al. (1996).

Protocolo: Se extrae la sangre de un paciente sano, se separa los neutrófilos mediante el método de ficoll según el procedimiento mostrado en la figura 3-4, se garantiza una concentración de ( $10^7$  células/ml, suspensión la cual es cultivada a 37°C por 30 minutos). Se prepara una solución madre de 500ppm de extracto total redissuelto en solución modificada de Hank's enriquecida con cantidad suficiente de dimetilsulfóxido (hasta el 10%) para solubilizar los sólidos. Posteriormente se elabora diluciones de 12.5, 25, 50 y 100 ppm.

Una vez preparadas estas soluciones se mezcla la suspensión de células previamente incubadas con las diluciones de de 12.5, 25, 50 y 100 ppm y finalmente se añade el WST-1 (250  $\mu$ M) y se procede a incubar durante 3 horas antes de la medición de las absorbancias; las cantidad añadidas se basan en el protocolo experimental mostrado en el Tabla 1-2. La absorbancia fue medida a 450 nm. Triton X-100 (0.1%) fue usado como control negativo mostrando un 0.00% de viabilidad celular. La densidad óptica representa la media de cinco réplicas experimentales (Berridge, 2005)



**Figura 5-3.** Protocolo para el aislamiento de neutrófilos humanos.  
Elaborado por: (Orna, 2015)

**Tabla 1-2.** Preparación de las muestras de ensayo para el análisis de citotoxicidad.

TRATAMIENTOS	Compuesto de prueba/controles, $\mu\text{L}$	Suspensión de células, $\mu\text{L}$	WST-1, $\mu\text{L}$
<i>Control DMSO 10%</i>	100	140	10
<i>Control TRITON X-100 0.1%</i>	100	140	10
<i>[Muestra]1, 200 ppm</i>	100	140	10
<i>[Muestra]2, 100 ppm</i>	100	140	10
<i>[Muestra]3, 50 ppm</i>	100	140	10
<i>[Muestra]4, 25 ppm</i>	100	140	10
<i>[Muestra]5, 12.5 ppm</i>	100	140	10

Fuente: (Janeta, 2015)

Modificado por: (Orna, 2015)

El porcentaje de viabilidad celular (Número de neutrófilos vivos) es calculado según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Viabilidad celular} = \frac{\text{Absorbancia del compuesto de estudio}}{\text{Absorbancia del compuesto control DMSO (máximo de viabilidad celular)}}$$

## 2.12. Evaluación de la actividad ansiolítica

El laberinto en cruz elevado o EPM por sus siglas en inglés se compone de dos brazos abiertos perpendiculares (30cm x 5cm) y dos brazos cerrados perpendiculares (30cm x 5cm x 25cm). Los brazos abiertos y cerrados se conectan por una plataforma central (5cm x 5cm). El laberinto se encuentra a 50 cm por encima del suelo. Una hora después de los tratamientos orales, el animal se coloca en el centro del laberinto con su nariz en la dirección de uno de los brazos cerrados. El ratón se observó durante 5 min, y los siguientes parámetros fueron controlados: (1) el número de entradas en los brazos abiertos y cerrados y (2) el tiempo dedicado por el animal en los brazos abiertos y cerrados. Los compuestos ansiolíticos reducen la aversión natural del animal para huir hacia los brazos cerrados y promueven la exploración de los brazos abiertos. El aparato debe ser limpiado cuidadosamente con solución de etanol al 10% después de cada prueba (Cardoso, Soncini, & Giusti-Paiva, 2009, pp. 325-327).

### **2.12.1. Laberinto en Cruz elevado (EPM)**

El laberinto en cruz elevado o EPM por sus siglas en inglés se compone de dos brazos abiertos perpendiculares (30cm x 5cm) y dos brazos cerrados perpendiculares (30cm x 5cm x 25cm). Los brazos abiertos y cerrados se conectan por una plataforma central (5cm x 5cm). El laberinto se encuentra a 50 cm por encima del suelo. Una hora después de los tratamientos orales, el animal se coloca en el centro del laberinto con su nariz en la dirección de uno de los brazos cerrados. El ratón se observó durante 5 min, y los siguientes parámetros fueron controlados: (1) el número de entradas en los brazos abiertos y cerrados y (2) el tiempo dedicado por el animal en los brazos abiertos y cerrados. Los compuestos ansiolíticos reducen la aversión natural del animal para huir hacia los brazos cerrados y promueven la exploración de los brazos abiertos. El aparato debe ser limpiado cuidadosamente con solución de etanol al 10% después de cada prueba (Cardoso, Soncini, & Giusti-Paiva, 2009, p. 326).

### **2.12.2. Ensayo de Campo Abierto (OFT)**

La arena de campo abierto (60cm x 60cm) se compone de un pizo blanco dividido en 16 cuadrados (15cm x 15cm), encerrado por muros continuos de 40 cm de alto. En esta prueba, cada ratón se colocó en el centro del campo abierto, que era novedoso para el animal. El número de entradas a los cuadros de la periferie y al centro se contó considerando la entrada con las 4 patas, anotadas durante 5 min. El comportamiento del ratón fue gravado de forma continua por una cámara de video que se coloca sobre la estructura.

El efecto timotáctico fue considerado como una relacion entre el número de entradas en la parte central como proporcion de las entradas totales. La arena se limpió cuidadosamente con solución de etanol al 10% después de cada prueba (Cardoso, Soncini, & Giusti-Paiva, 2009, p. 326).

## **2.13. Evaluación de la acción Gabaérgica**

Para la evaluación de la actividad de los diferentes extractos sobre los receptores GABA, se sigue el mismo procedimiento que para el análisis de la actividad ansiolítica, con la variante de administración intraperitoneal de Flumazenil a una dosis de 1mg/kg.

Flumazenil es un agonista inverso, mal denominado antagonista generalmente de los receptores GABA<sub>A</sub>, cumple una función de denegar los efectos de las benzodiazepinas sobre los receptores

GABA en zonas alostéricas. El fundamento del uso de esta droga se basa en antagonizar los efectos probables sobre los receptores GABA<sub>A</sub> de las diferentes concentraciones de los extractos de Canayuyo y mediante modelos animales evaluar la actividad conductual frente a un modelo de ansiedad ya estudiado del cual ya se habló en el apartado 3.9. Con esta finalidad el Flumazenil es administrado vía intraperitoneal 15 minutos después de la administración oral de las diferentes grupos de ensayo, 3º minutos después se mide la actividad en los modelos EPM y OFT.

#### **2.14. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos tanto para la evaluación del efecto ansiolítico como para la evaluación de la actividad Gabaérgica se realizaron utilizando el software Sigmaplot versión 11, expresando los resultados como  $\text{media} \pm \text{S.E.M.}$ , presentando las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos mediante la aplicación de un análisis de varianza (ANOVA) o Kruskal Wallis en dependencia de los resultados de los supuestos en cuanto a normalidad, homocedastisidad y homogeneidad, seguido por la prueba de Newman-Keuls. P-valores de menos de 0,05 ( $p < 0,05$ ) fueron considerados significativos.

## CAPÍTULO III

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

#### 3.1. Control de calidad de la droga cruda

**Tabla 1-3.** Resultados del control de Calidad Físico químico de la droga cruda desecada.

<i>Ensayos</i>	<i>Valor experimental</i>	<i>Límites de referencia</i>	<i>Normativa referencial</i>
<b>Contenido de Humedad</b>	12,1 ± 0,011	14%	Normativa Ecuatoriana de Fitoterápicos
<b>Cenizas Totales</b>	1,2 ± 0,032	5%	Farmacopea Española
<b>Cenizas solubles en agua</b>	0,76 ± 0,041	2%	Farmacopea Española
<b>Cenizas insolubles en HCl</b>	0,21 ± 0,012	1%	Farmacopea Española

Elaborado por: (Orna, 2015)

Dentro del control de calidad de la droga cruda es fundamental analizar el contenido de humedad, parámetro el cual nos revela la estabilidad de la materia prima, así como la eficacia del proceso de desecación y almacenamiento, controlar este parámetro es fundamental para evitar errores en la evaluación de efectos a estudiar. Referente a la determinación de cenizas es fundamental considerar la cantidad de sales inorgánicas, tales como: fosfato, carbonato, cloruro, sulfato, nitrito de sodio, potasio, calcio, que constituyen los compuestos más frecuentes. También pueden encontrarse presentes sales de ácidos orgánicos: málico, oxálico, acéticos, péptico, etc., Por otra parte ciertos elementos minerales pueden encontrarse formando complejos de moléculas orgánicas.



El contenido de cenizas nos revela la dureza de la especie en función de la naturaleza del suelo, esto establece si una droga vegetal es apta o no para consumo humano en sus diferentes presentaciones desechando la idea de presencia de sustancias extrañas. Las cenizas solubles en agua nos brindan una idea de la cantidad de sales solubles, mientras las cenizas insolubles en HCl nos permiten determinar la cantidad de oxalatos y carbonatos principalmente.

Al respecto se puede decir que los parámetros de control de calidad se encuentran dentro de los límites superiores permisibles, garantizando que los análisis respectivos son efectivos para una posible investigación *in vivo*.

### **3.2. Análisis cualitativo**

En el Tabla 2-3 se presenta los resultados del tamizaje fitoquímico realizado en los diferentes extractos de *Sonchus oleraceus*, positivo para los ensayos de Baljet, Liberman Buchard, Fehling, resinas, FeCl<sub>3</sub>, antocianidinas, Shinoda y ensayo de la espuma. Al respecto se puede agregar que los resultados obtenidos se relacionan satisfactoriamente con el estudio “Chemical Constituents of *Sonchus oleraceus* L.” realizado por Xu, Yan & Liang, Jing-Yu en el año 2005, para la caracterización de los metabolitos secundarios presentes en la planta, en el cual se informa la presencia de flavonoides de tipo flavona y sus glucósidos; Apigenina, Apigenina-7-glucosido, apigenina-7-O-β-D-glucuronido metil éster, apigenina-7-O-β-D-glucuronido etil éster, apigenin-7-O-β-D-glucopiranuronido, luteolina, luteolina-7-O-β-D-glucósido; también se informa la presencia de triterpenos como el caso del ácido oleanólico y germanicil acetato, este último posee una sustitución tipo ester en el carbono 3 que puede dar positivo en el ensayo de la espuma; un eudesmanólido (sesquiterpenlactona) de estructura (3β-hydroxy-6β,7α,11β-H-eudesm-4-en-6,12-olide) y por último también se describe la presencia de 1-cerotol, un compuesto del cual se tiene muy poca información.

**Tabla 2-3.** Resultados del tamizaje fitoquímico en los diferentes extractos de *Sonchus oleraceus*

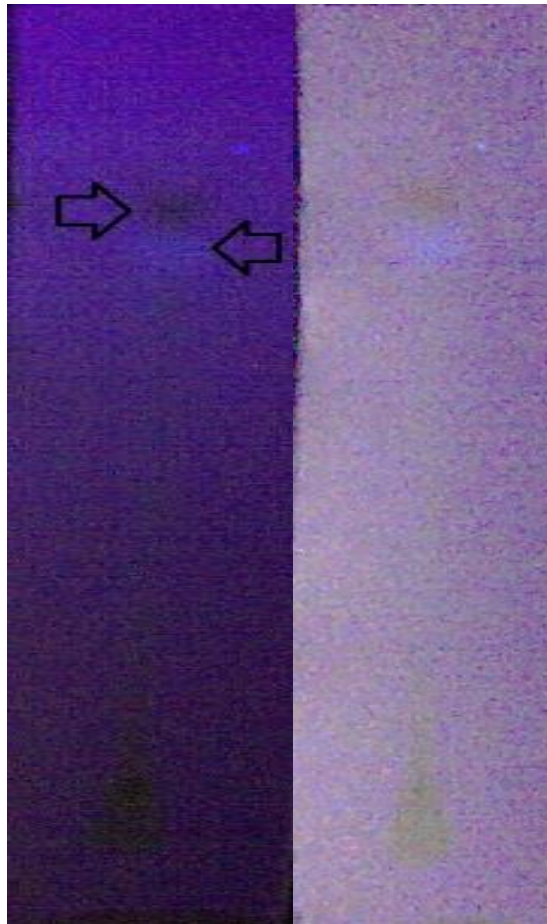
<i>Ensayos</i>	<i>Tipo de compuesto en estudio</i>	<i>Extracto etéreo</i>	<i>Extracto alcohólico</i>	<i>Extracto acuoso</i>
<b>Ensayo de Catequinas</b>	Catequinas	N/A	Negativo	N/A
<b>Ensayo de Baljet</b>	Lactonas y coumarinas	Positivo	Positivo	N/A
<b>Ensayo de Liberman Buchard</b>	Triterpenos y esteroides	Positivo	Positivo	Positivo
<b>Ensayo de espuma</b>	Saponinas	N/A	Positivo	Positivo
<b>Ensayo de Borntrager</b>	Quinonas	N/A	Negativo	N/A
<b>Ensayo de Resinas</b>	Resinas	N/A	Positivo (++)	N/A
<b>Fehling</b>	Azúcares reductores	N/A	Positivo (+++)	Positivo (+++)
<b>Dragendorff, Mayer &amp; Wagner</b>	Alcaloides	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Ensayo de FeCl<sub>3</sub></b>	Compuestos fenólicos	N/A	Positivo	Positivo
<b>Antocianidinas</b>			Positivo	
<b>Ensayo de Shinoda</b>	Flavonoides	Positivo (++)	Positivo (+++)	Positivo (+++)
<b>Ensayo de Sudam</b>	Grasas	Negativo	N/A	N/A

+++ (Abundante); ++ (Moderado); + (escaso); N/A (No aplica)

Elaborado por: (Orna, 2015)

### 3.3. Análisis de cromatografía en capa fina CCF

El análisis cromatográfico pretende la identificación de flavonoides debido al interés de los mismos para el estudio, por lo tanto se utilizan fases móviles polares con la intención de separar compuestos apolares como lo son apigenina y luteolina.



**Figura 1-3.** Cromatografía en capa fina para el extracto hidroalcohólico de *Sonchus oleraceus*, visto al uv lejano.  
Elaborado por: (Orma, 2015)

En la fotografía 1-3 se puede apreciar mediante el uso de la luz UV (lejano) dos compuestos separados mediante una fase móvil compuesta por acetato de etilo: metil-isobutilcetona: ácido fórmico: agua (50:27:10:10) con un valor de constante dieléctrica de 21.1721. El cálculo de la constante dieléctrica y los factores de retención se presenta a continuación:

### Calculo de la constante dieléctrica

$$\epsilon_r = \frac{(6*50)+(13.1*30)+(58*10)+(82*10)}{100} = 20.93$$

### Calculo de los Rf

$$Rf1 = \frac{Ds}{Df} = \frac{6.6}{7} = 0.9428$$

$$Rf2 = \frac{Ds}{Df} = \frac{5.9}{7} = 0.8429$$

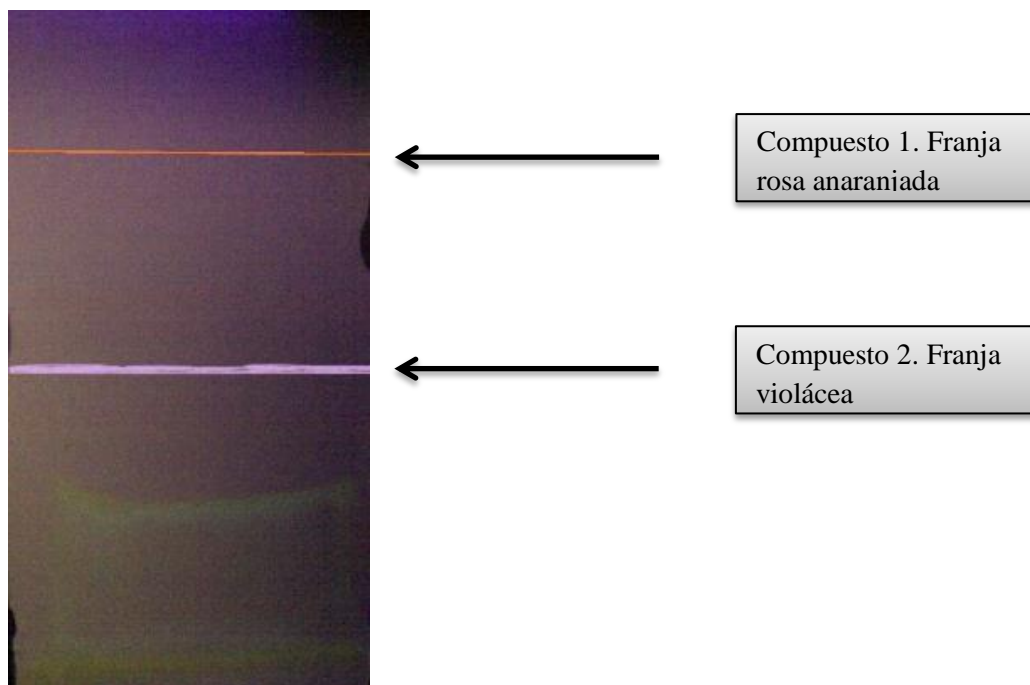
#### Dónde:

- Rf: Factor de retención (retention factor; por sus siglas en ingles)
- Ds: distancia de la solución de prueba
- Df: distancia del frente del solvente

El primero de los compuestos presenta características de color rosa-anaranjado según lo establecido por (Conde & Elvira., 1994) se fundamenta que la mancha roza-anaranjada con Rf=0.9428 puede ser tanto luteolina como apigenina, debido a la polaridad semejante de ambos compuestos así como la similaridad estructural, variando tan solo la presencia de un OH más en 4' para luteolina; el segundo compuesto presenta una coloración azul de mayor intensidad a la primera con un Rf=0.8429, la cual estaría relacionada a compuestos o derivados de flavonas no glicosilados en general (Conde & Elvira., 1994).

### 3.4. Análisis espectroscópico

En el presente estudio se evaluó mediante espectroscopia UV los compuestos aislados mediante cromatografía preparativa en placa con una fase móvil modificada mínimamente de la utilizada para el análisis CCF; acetato de etilo: metil-isobutilcetona: ácido fórmico: agua (50:27:10:10); fase con la cual se logra separar dos compuestos el primero con un Rf=0,96 y el segundo con Rf= 0.8392 (Véase fotografía 2-3). Se depositó las raspaduras de sílica en etanol al 96% caliente para la mejor solubilización de los compuestos basado en el estudio elaborado por Xiao, Shao, Yan & Zhang publicado en 2011 en el cual se evaluó la solubilidad de apigenina y sus glicósidos. (Xiao, et. al, 2011, pp. 240-243)

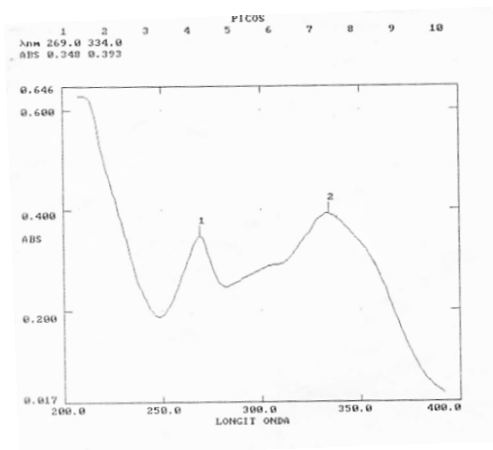


**Figura 2-3.** Placa preparativa con fase móvil acetato de etilo: metil-isobutilcetona: ácido fórmico: agua (50:27:10:10).  
**Elaborado por:** (Orma, 2015)

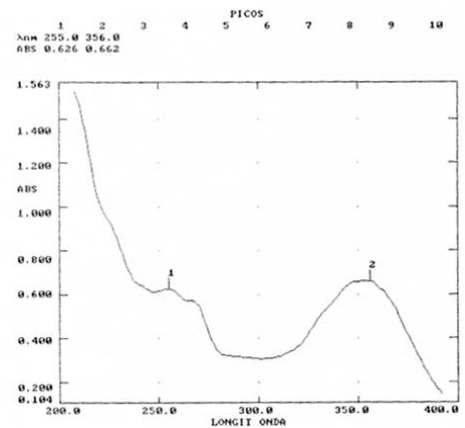
Posteriormente al filtrado de las soluciones se realiza un barrido de 200 a 500 nm (véase figura 3-3), para el compuesto (a) se puede evidenciar una  $\lambda=334\text{nm}$  (pico N°2), perteneciente a la banda I de un flavonoide que se sitúa en el rango de 300-390 (asociada con la funcionalidad cinamoilo), y el pico II presenta  $\lambda=269\text{nm}$  (pico N°1), el cual obedece a la absorción propia de un anillo aromático (Tabla 4-1). Los resultados demuestran ser similares a los descritos para apigenina en el estudio realizado por Mammen & Mammen en el 2012 para la evaluación de los barridos espectrales de diferentes flavonoides en solución etanólica, y posterior adición de  $\text{AlCl}_3$  y  $\text{AlCl}_3+\text{CH}_3\text{COOK}$  respectivamente.

(Mammen & Mammen, 2012, pp. 1365-1368)

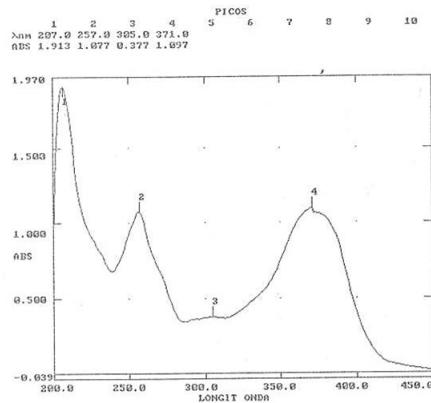
En los estudios químico-taxonomicos de *Sonchus oleraceus* se plantea la presencia de apigenina, luteolina y sus glicósidos, por lo tanto es complicado discriminar un compuesto de otro en la placa preparativa, considerando la gran similaridad estructural de ambos compuestos, siendo así es correcto afirmar que la franja roza-anaranjada aislada es una mezcla de ambas flavonas. (Giner, et. al, 1993, pp. 617-620) (Xu & Liang, 2005, pp. 7). Tomando en cuenta esta consideración se puede evaluar la presencia de un tercer pico a 349 nm, longitud de onda a la que absorbe la banda I del compuesto luteolina (fig. 4-3. a).



(1)

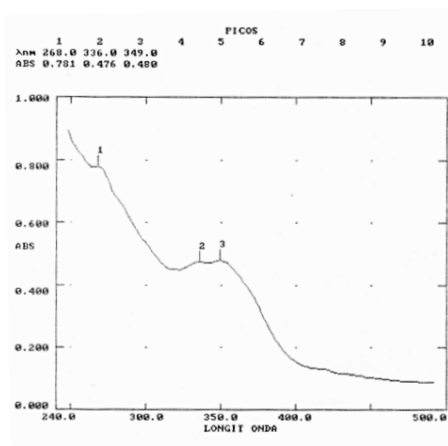


(2)

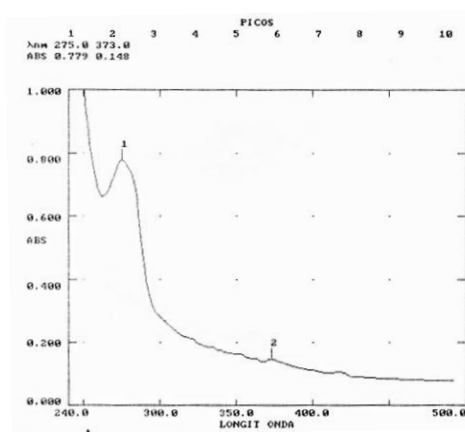


(3)

**Figura 3-3.** Barridos UV de 200-400nm de los estándares apigenina (1), luteolina (2) y quercetina (3); a una concentración de 5ug/mL.  
 Elaborado por: (Orna, 2015)



(a)

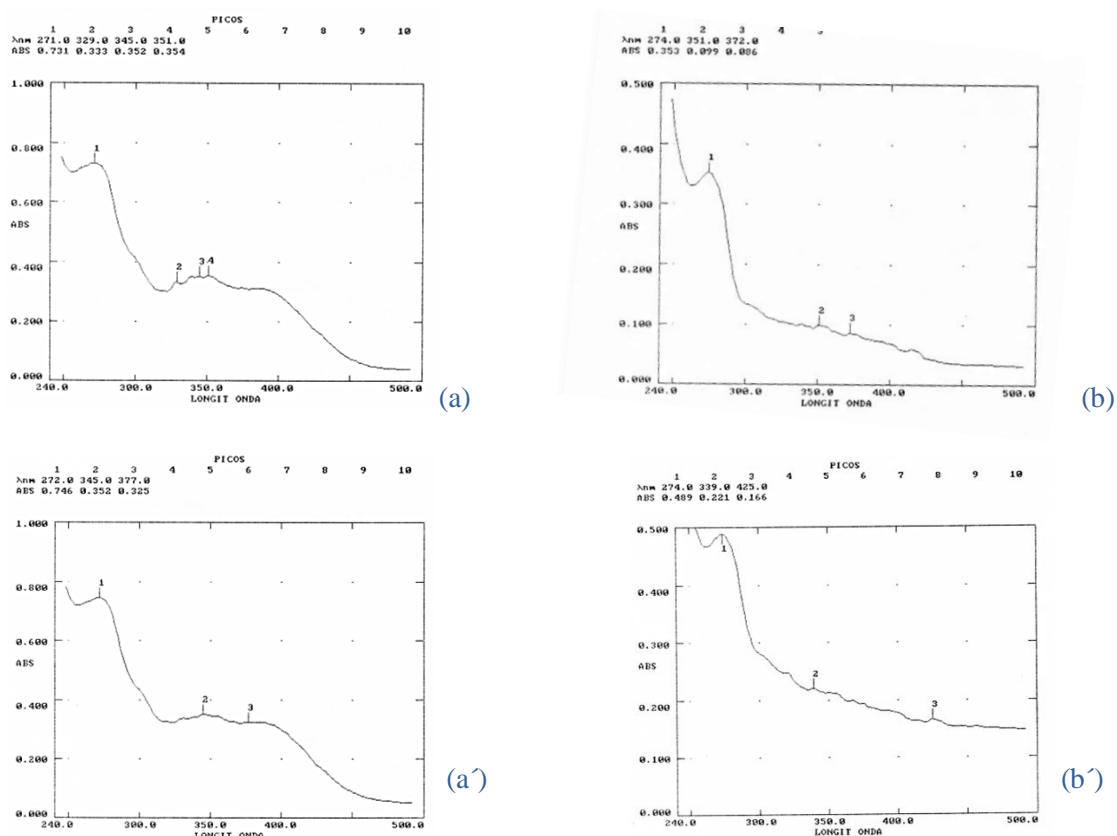


(b)

**Figura 4-3.** Barridos espectrales de 200-500 nm de los compuestos aislados mediante CCFP a partir del extracto etanólico total; (a) franja roza-anaranjado y (b) franja azul-violácea al UV.  
 Elaborado por: (Orna, 2015)

Un segundo compuesto aislado analizado denominado (b), corresponde a la franja azul-violácea (fig. 4-3), este compuesto presenta dos picos de absorción, el pico número 2,

presenta una absorción a  $\lambda=373\text{nm}$  perteneciente a la banda I de un flavonoide que se sitúa en el rango de 300-390, valor que correspondería a un flavonol, por la presencia de un hidroxilo en posición 3; el pico 1 presenta  $\lambda=275\text{nm}$ , valor que se encuentra en el rango de 250-280nm para la banda II, aunque tal valor no coincide con los de flavonoles más comunes.



**Figura 5-3.** Barridos espectrales de 200-500 nm de los compuestos aislados mediante CCFP a partir del extracto etanólico total, más la adición de reactivos de desplazamiento.  
Elaborado por: (Orna, 2015)

El compuesto (a) representa la franja roza-anaranjada, mientras el compuesto (b) representa la franja azul-violácea aislada por CCFP. Las figuras son presentadas son el resultado final de la adición de los reactivos de desplazamiento, (a) compuesto a +  $\text{AlCl}_3$  10%, (a') compuesto a +  $\text{AlCl}_3$  10% y  $\text{CH}_3\text{COOK}$ ; (b) compuesto b +  $\text{AlCl}_3$  10%, (b') compuesto b +  $\text{AlCl}_3$  10% y  $\text{CH}_3\text{COOK}$ .

Mediante el uso de reactivos de desplazamiento se determina la presencia de apigenina al añadir  $\text{AlCl}_3$  se produce la quelación correspondiente a 345 nm característica para apigenina; aunque la mezcla indiferenciada de apigenina-luteolina a la que se hizo mención anteriormente en el análisis para CCF puede interferir en la identificación de la misma mostrándose más picos a los esperados. El compuesto b por su lado presenta un pico a 274 nm, el cual no es específico de ningún flavonoide en especial, pero con la adición de +  $\text{AlCl}_3$  10% y  $\text{CH}_3\text{COOK}$  se determina

un pico a 425 nm para el pico I, el cual es característico de tres tipos de Flavonoles, Kaempferol, quercetina y mirecetina, por referencias anteriores establecidas por Giner y colaboradores existía la posibilidad de que este compuesto sea un derivado de quercetina, cuestión que es aclarada en el análisis HPLC (Giner, Et. Al, 1993, pp. 617-620).

**Tabla 3-3.** Desplazamientos espectrales observados en la absorción máxima para diferentes flavonas y flavonoles tratados con la adición de AlCl<sub>3</sub> y CH<sub>3</sub>COOK

Name of compound	Absorption maxima in ethanol (nm)	Absorption maxima on adding AlCl <sub>3</sub> (nm)	Absorption maxima on adding AlCl <sub>3</sub> and CH <sub>3</sub> COOK (nm)
<i>Flavonols</i>			
Kaempferol	265, 368	269, 424	269, 423
Quercetin	255, 371	271, 445	267, 426
Myricetin	255, 375	270, 444	268, 423
Gossypetin	260, 380	268, 443	273, 395
<i>Flavones</i>			
Apigenin	266, 335	283, 346	285, 337
Luteolin	255, 348	269, 425	273, 404
Orientin	255, 347	267, 426	270, 411
Acacetin	270, 326	277, 336	278, 330
Tricin	245, 350	278, 392	277, 382

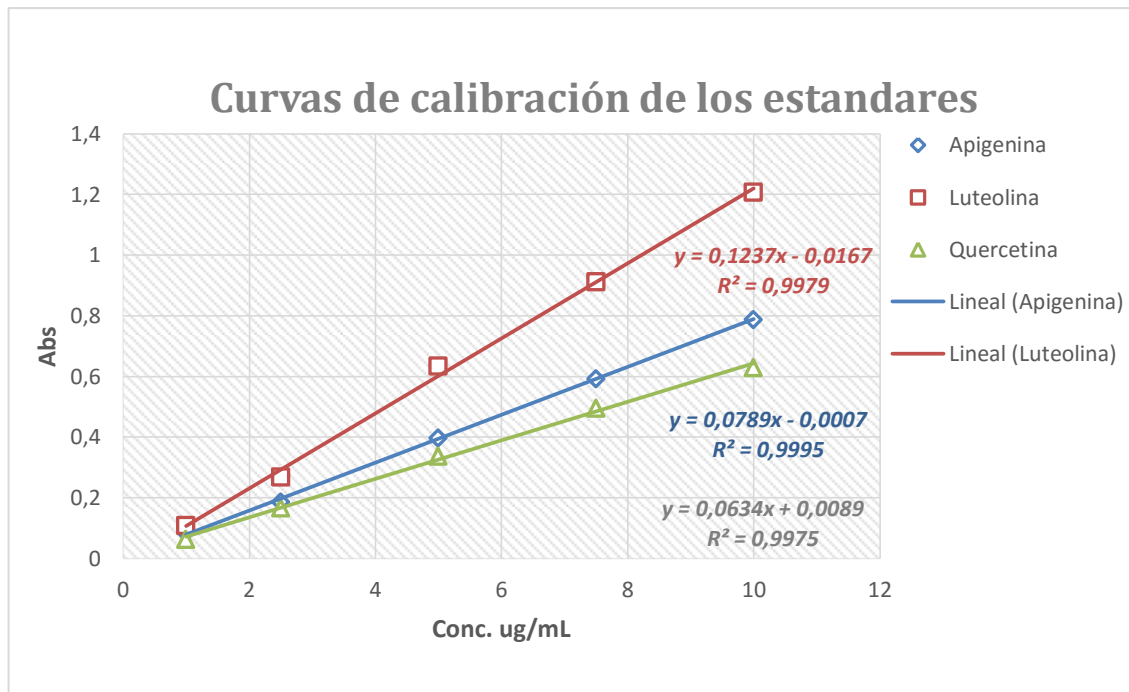
Fuente: (Mammen & Mammen, 2012)

**Tabla 4-3.** Resultados de la curva de calibración de los estándares flavónicos, Apigenina, Luteolina, Quercetina; empleados para la cuantificación de flavonoides totales. UV lejano.

Conc. ug/ml	Abs (Apigenina)	Abs (Luteolina)	Abs (Quercetina)
1	0,085	0,108	0,063
2,5	0,186	0,269	0,167
5	0,397	0,634	0,338
7,5	0,592	0,913	0,496
10	0,788	1,208	0,63

Elaborado por: (Orna, 2015)





**Figura 6-3.** Curva de calibración de los estándares de flavonoides utilizados para la cuantificación de flavonoides totales.

Elaborado: (Oma, 2015)

Una vez elaborada la curva de calibración para los tres estándares, apigenina, luteolina y quercetina se obtienen las siguientes ecuaciones de la recta:

- Apigenina;  $y = 0.0789x - 0.0007$
- Luteolina;  $y = 0.1237x - 0.0167$
- Quercetina;  $y = 0.0634x + 0.0089$ ; con coeficientes de relación de 0.9979; 0,9995 y 0.9975 respectivamente

Los resultados de las absorbancias de las mediciones del extracto etanólico hidrolizado a  $\lambda=335\text{nm}$ ,  $\lambda=356\text{nm}$  y  $\lambda=375$  correspondientes a las longitudes de onda de la banda I para los estándares apigenina, luteolina y quercetina (Fig.1-3) se presentan a continuación.

**Tabla 5-3.** Resultados de las absorbancias obtenidas a las longitudes de onda del pico I, para los estándares puros, apigenina, luteolina y quercetina respectivamente.

	Abs. $\lambda=334$	Abs. $\lambda=356$	Abs. $\lambda=375$
	0,385	0,404	0,174
	0,404	0,408	0,174
	0,403	0,41	0,175
<b>Total</b>	<b>0,3973<math>\pm</math>0,0107</b>	<b>0,4073<math>\pm</math>0,031</b>	<b>0,1743<math>\pm</math>0,0006</b>

Elaborado por: (Orna, 2015)

Las concentraciones son calculadas como  $\mu\text{g/mL}$  equivalentes a apigenina, luteolina y quercetina respectivamente, mediante interpolación en la ecuación de la recta correspondiente, a continuación de muestran los resultados:

**Tabla 6-3.** Resultados de la cuantificación de flavonoides totales expresados como apigenina, luteolina y quercetina en el extracto etanólico total, el extracto hidrolizado y la muestra de ensayo.

	Expresado como apigenina ( $\lambda=334$ )	Expresado como Luteolina ( $\lambda=356$ )	Expresado como Quercetina ( $\lambda=375$ )
<i>Concentración (<math>\mu\text{g/mL}</math>) en el extracto hidrolizado 1:10000</i>	5,044782425	3,427917004	2,890115668
<i>Concentración (<math>\mu\text{g/mL}</math>) en el extracto hidrolizado total</i>	50447,82425	34279,17004	28901,15668
<i>Concentración (<math>\text{mg/mL}</math>) en el extracto etanólico total</i>	50,4478	34,2792	28,9012

Elaborado por: (Orna, 2015)

Considerando que el extracto etanólico total se obtuvo de la maceración de 50g de planta se calcula el porcentaje de flavonoides totales expresados como apigenina, luteolina y quercetina respectivamente.

$$\% \text{Flavonoides totales (exp. Apigenina)} = \frac{5,0448 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} * 250\text{mL} * 1\text{g}}{1000\text{mg} * 50\text{g}} * 100 = 2,5224$$

$$\% \text{Flavonoides totales (exp. Luteolina)} = \frac{3,4279 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} * 250\text{mL} * 1\text{g}}{1000\text{mg} * 50\text{g}} * 100 = 1,7140$$

$$\% \text{Flavonoides totales (exp. Quercetina)} = \frac{2,8901 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} * 250\text{mL} * 1\text{g}}{1000\text{mg} * 50\text{g}} * 100 = 1,4451$$

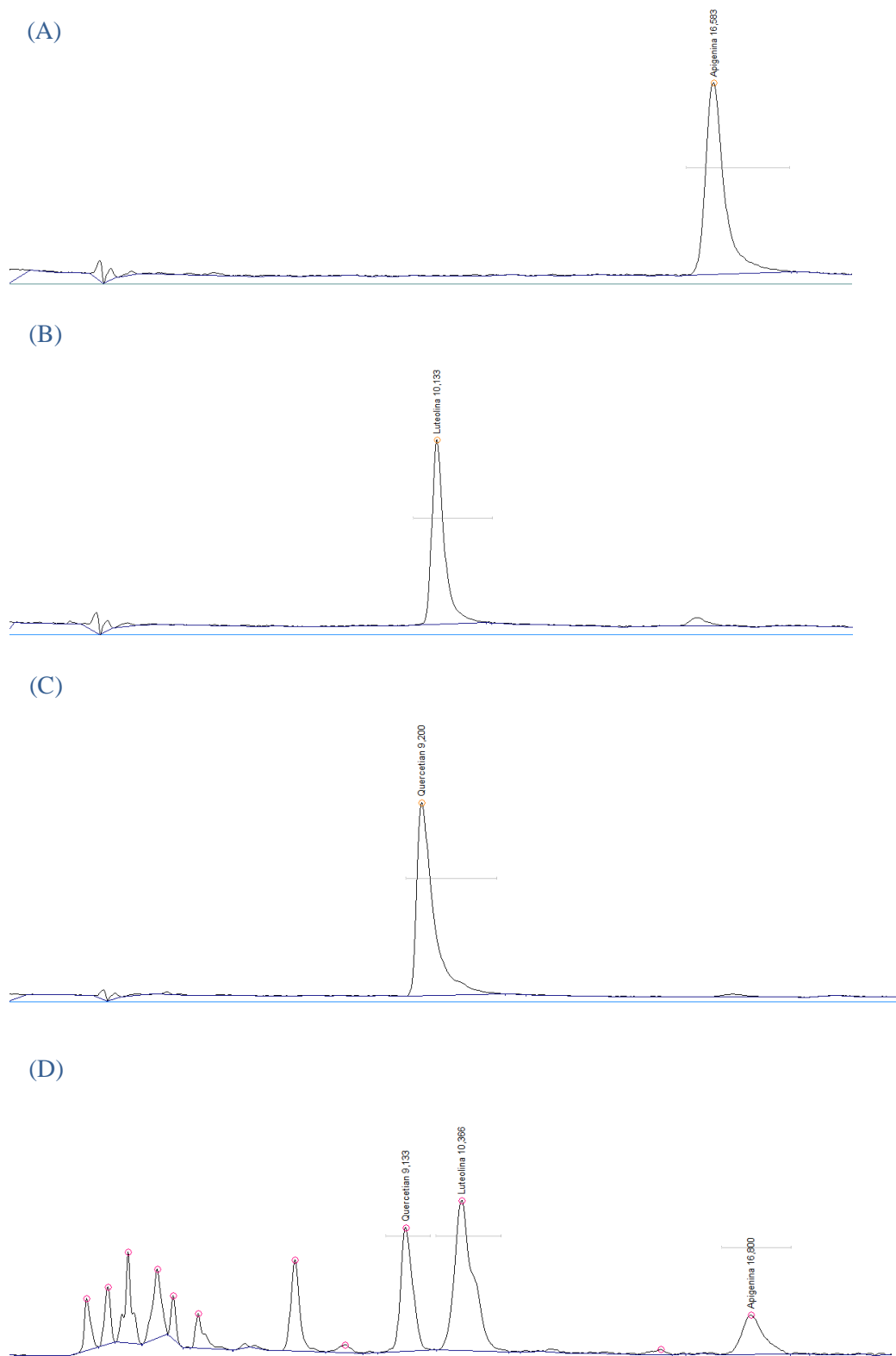
Es importante considerar que no existen datos bibliográficos de la cantidad de flavonoides totales para *Sonchus oleraceus*, ni especies similares.

### 3.5. Análisis HPLC

Apigenina y luteolina poseen estructuras similares, por lo tanto requieren de una fase móvil polar para una mejor separación de las agliconas, en función de su logP el cual es mayor para luteolina, debido a la presencia de un OH más en posición 3'. La Fm seleccionada es ácido fórmico: acetonitrilo: metanol (60:16:24) basada en el estudio "Pharmacokinetic study of luteolin, apigenin, chrysoeriol and diosmetin after oral administration of Flos Chrysanthemi extract in rats", en el cual se valida el método para cuantificar apigenina, luteolina, crisoeriol y diosmetina con estándar interno quercetina, con una linealidad de 0.025–10 µg/ml (Chen Z. , Kong, Song, Li, & Jiang, 2012, pp. 1616-1622). El método planteado por (Chen Z. , Kong, Song, Li, & Jiang, 2012, pp. 1616-1622) es mínimamente modificado para el presente estudio; Tª=35±1°C con un flujo de 1.3 mL/min.

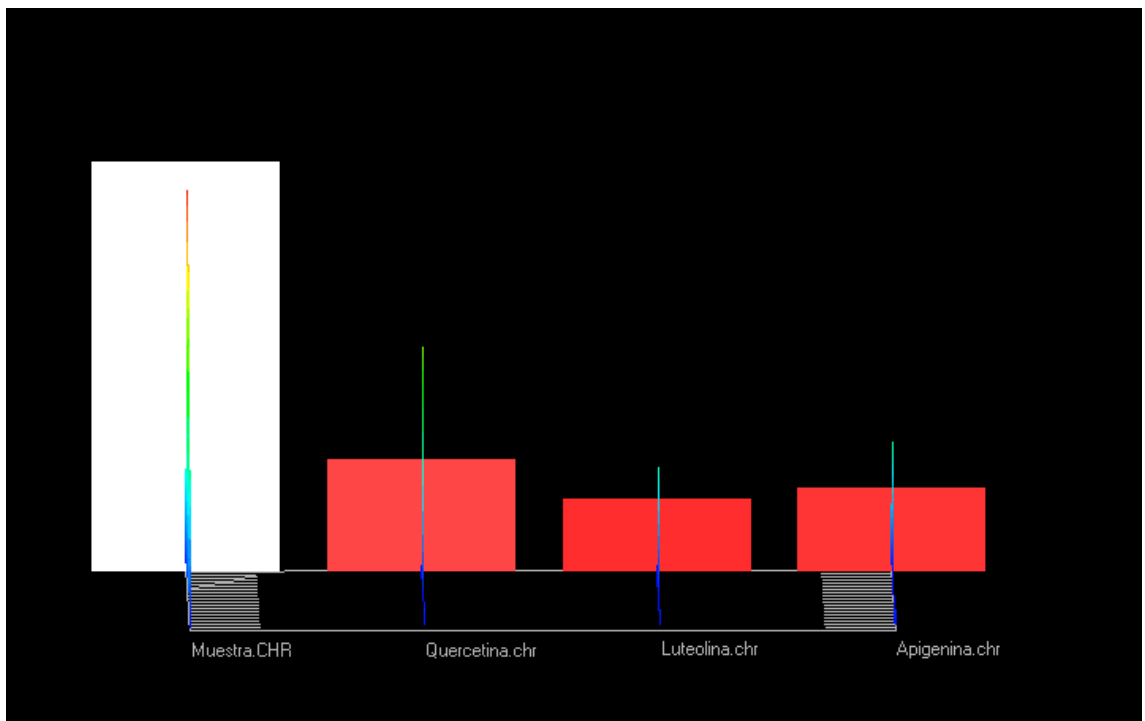
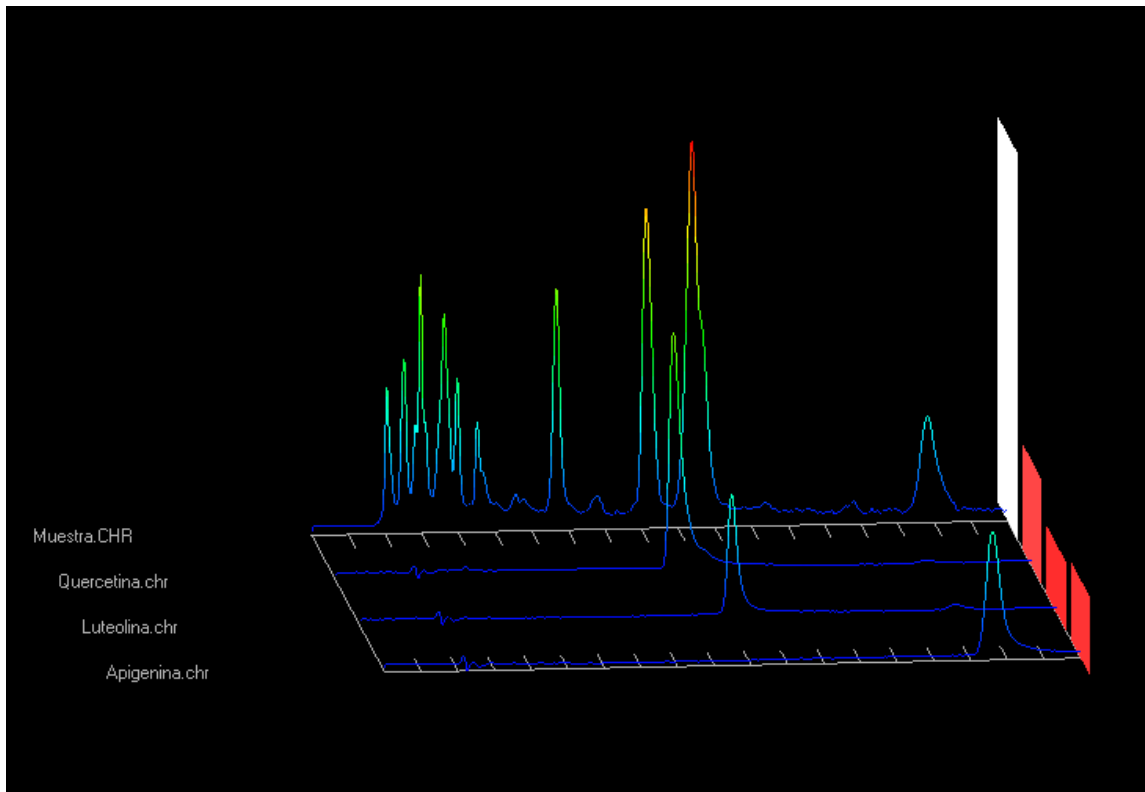
Es importante considerar que la planta de estudio presenta en su estructura los siguientes flavonoides; apigenina, apigenina-7-glucosido, apigenina-7-O-β-D-glucuronido metil éster, apigenin-7-O-β-D-glucuronide etil éster, apigenin-7-O-β-D-glucopirauronido, luteolina y luteolina-7-O-β-D-glucósido (Xu & Liang, Chemical Constituents of *Sonchus oleraceus* L.[J], 2005, pp. 7); otros autores establecen la presencia del compuesto quercetin-3-glucósido. Una vez el extracto es hidrolizado la muestra presenta en su mayoría agliconas, apigenina, luteolina y como se podrá evidenciar en los cromatogramas obtenidos también existe quercetina, avalando lo señalado por (Giner, Ubeda, Just & Serrano, 1993, pp. 617-620) sobre la presencia de quercetina como quercetin-3-glucósido.

Los cromatogramas tanto de los estándares como de las muestra de ensayo se muestran en la figura 5-3 y los resultados se muestran en el Tabla 7-3.



**Figura 7-3.** Cromatogramas HPLC (A) Estándar de apigenina (5ug/ml), (B) estándar de luteolina (5ug/ml), (C) estándar de quercetina (10ug/ml), (D) muestra etanólica hidrolizada diluida 1:10

Elaborado por: (Orma, 2015)



**Figura 8-3.** Cromatograma 3D, en donde se representa los 3 estándares apigenina, luteolina, quercetina y la muestra.  
 Elaborado por: (Orna, 2015)

**Tabla 7-3.** Resultados de la cuantificación de flavonoides totales mediante HPLC, expresados como porcentaje de Apigenina, Luteolina y Quercetina.

Porcentaje de Flavonoides	
% Flavonoides Totales (exp. Apigenina)	0,4133
% Flavonoides Totales (exp. Luteolina)	1,4123
% Flavonoides Totales (exp. Quercetina)	0,8536
<i>Total</i>	2,6792

Elaborado por: (Orna, 2015)

Mediante cromatografía líquida de alta eficiencia se cuantifico 0,4133% de apigenina; 1,4123% de luteolina y 0,8536% de quercetina; que sumado brindan un resultado de 2,6792% de flavonoides totales.

### 3.6. Evaluación de la citotoxicidad de neutrófilos aislados

**Tabla 8-3.** Resultados del conteo celular sanguíneo del paciente voluntario.

Globulos blancos	VN	V. Exp.
<i>Neutrofilos</i>	40-60%	59
<i>Leucocios</i>	20-40%	30
<i>Monoitos</i>	2-8%	8
<i>Eosinofilos</i>	1-4%	1
<i>Basófilos</i>	0,5-1%	2

Elaborado por: (Orna, 2015)

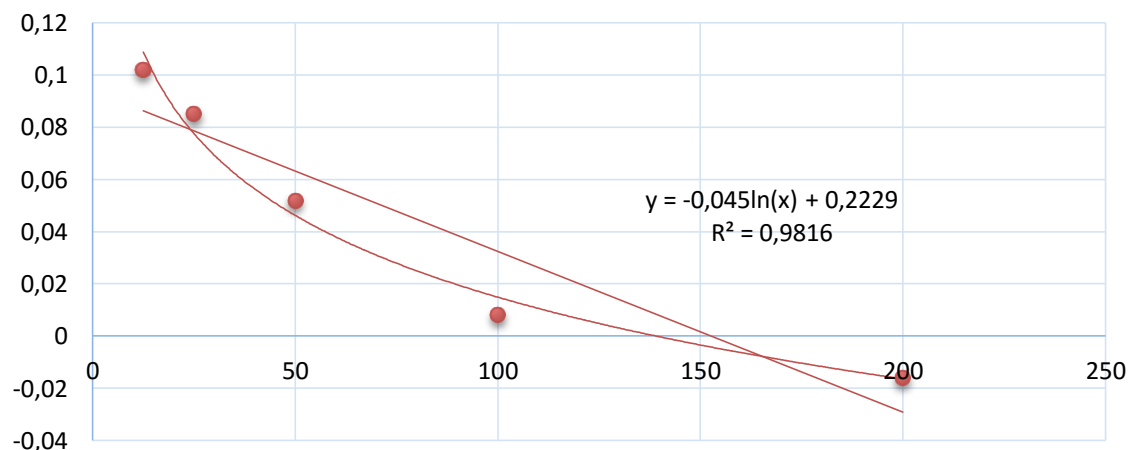
Mediante el siguiente cálculo se determina el número de células (neutrófilos) por milímetro cúbico existente en la muestra de sangre, mediante la cual se hacen los cálculos respectivos para la suspensión de  $10^7$  células/ml.

$$\text{Conc. globulos blancos} = \frac{N^{\circ} \text{ cell} * \text{Factor de dilución}}{N^{\circ} \text{ cuadrantes} * \text{Factor de volumen}}$$

$$\text{Conc. globulos blancos} = \frac{150\text{cell} * 20}{4 * 0,1\text{mm}^3} = 7500\text{cell}/\text{mm}^3$$

Una vez realizado el ensayo colorimétrico se obtuvieron los siguientes resultados:

### Citotoxicidad en neutrofilos aislados



**Figura 9-3.** Regresión logarítmica de las absorbancias obtenidas en el ensayo de citotoxicidad.  
Elaborado por: (Orma, 2015)

**Tabla 9-3.** Resultados del porcentaje de viabilidad celular calculados para las diluciones problema del extracto etanólico de Canayuyo.

% de viabilidad celular del extracto total a diferentes concentraciones	
Concentración (ug/mL)	% de viabilidad
200	0
100	3,63
50	23,64
25	38,64
12,5	43,36

**Nota:** Triton X-100 (0,1%) fue utilizado como control negativo, presentando 0% de viabilidad celular.

Elaborado por: (Orma, 2015)

Como se puede observar en el Tabla 8-3 a una concentración máxima de 200 ppm el porcentaje de viabilidad celular es cero lo cual establece que a este nivel la toxicidad es aparentemente máxima, mientras a una concentración de 12,5 ppm la viabilidad celular es 46,36%, una viabilidad que en función del riesgo beneficio puede ser aceptable. Es importante recalcar la composición de la planta, ya que la toxicidad presente puede deberse a otros compuestos como sesquiterpenlactonas más no a los compuestos de interés como son apigenina, luteolina y quercetina que tienen efectos antioxidantes demostrados.

### 3.7. Evaluación del efecto ansiolítico

El análisis del efecto ansiolítico se llevó a cabo en un tiempo aproximado de 30 días, en los cuales los 15 primeros son un período de adaptación, seguidos de una semana de evaluación del efecto ansiolítico con 5 grupos, 3 de ellos las concentraciones problema a ensayar, 30 mg/kg; 100mg/kg y 300mg/kg de planta a administrar en ratones; un grupo control positivo a una concentración de 0,5 mg/kg de clonazepam y un blanco al cual se le administró polietilenglicol al 15%.

La última semana de ensayo se repite el proceso de evaluación con la adición de un control negativo aplicado a cada uno de los grupos, para poder así establecer si el efecto analizado tiene actividad sobre los receptores GABA.

Se realizaron dos modelos animales para la evaluación del efecto ansiolítico, laberinto en cruz elevado (EPM) y el ensayo de campo abierto (OFT), las consideraciones que con frecuencia se dan en el estudio son:

- Un mayor tiempo de permanencia en los brazos abiertos refleja menor ansiedad ante un entorno inmediato nuevo y novedoso que además genera vértigo.
- Un mayor tiempo de permanencia en los brazos cerrados refleja mayor miedo y ansiedad ante el entorno nuevo.
- A un mayor número de entradas a los brazos abiertos se considera un efecto ansiolítico identificado por una mayor actividad de exploración en una zona amenazante.
- Un mayor tiempo de permanencia en el centro del modelo OFT refleja menor ansiedad ante un entorno que sugiere miedo y estrés al animal, comparado con un bosque desierto en el cual los seres vivos de manera general tenemos miedo a ubicarnos en el centro en donde nos sentimos vigilados, amenazados.
- Un mayor tiempo de permanencia en la periferie refleja mayor ansiedad identificada por un reflejo de ubicarse hacia las esquinas, evitando la amenaza que supone el centro del modelo.
- A un mayor número de entradas en el centro del modelo se considera un efecto ansiolítico identificado por una mayor actividad de exploración denominado efecto “antitímotáctico.”



### 3.7.1. Ensayo de Laberinto elevado (EPM)

**Tabla 10-3.** Tiempo total transcurrido en los brazos abiertos. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).

B	CZP	C1	C2	C3
37	54	50	70	94
34	42	59	69	95
29	48	40	66	90

Elaborado por: (Orna, 2015)

**Tabla 11-3.** Número total de entradas en los brazos abiertos. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).

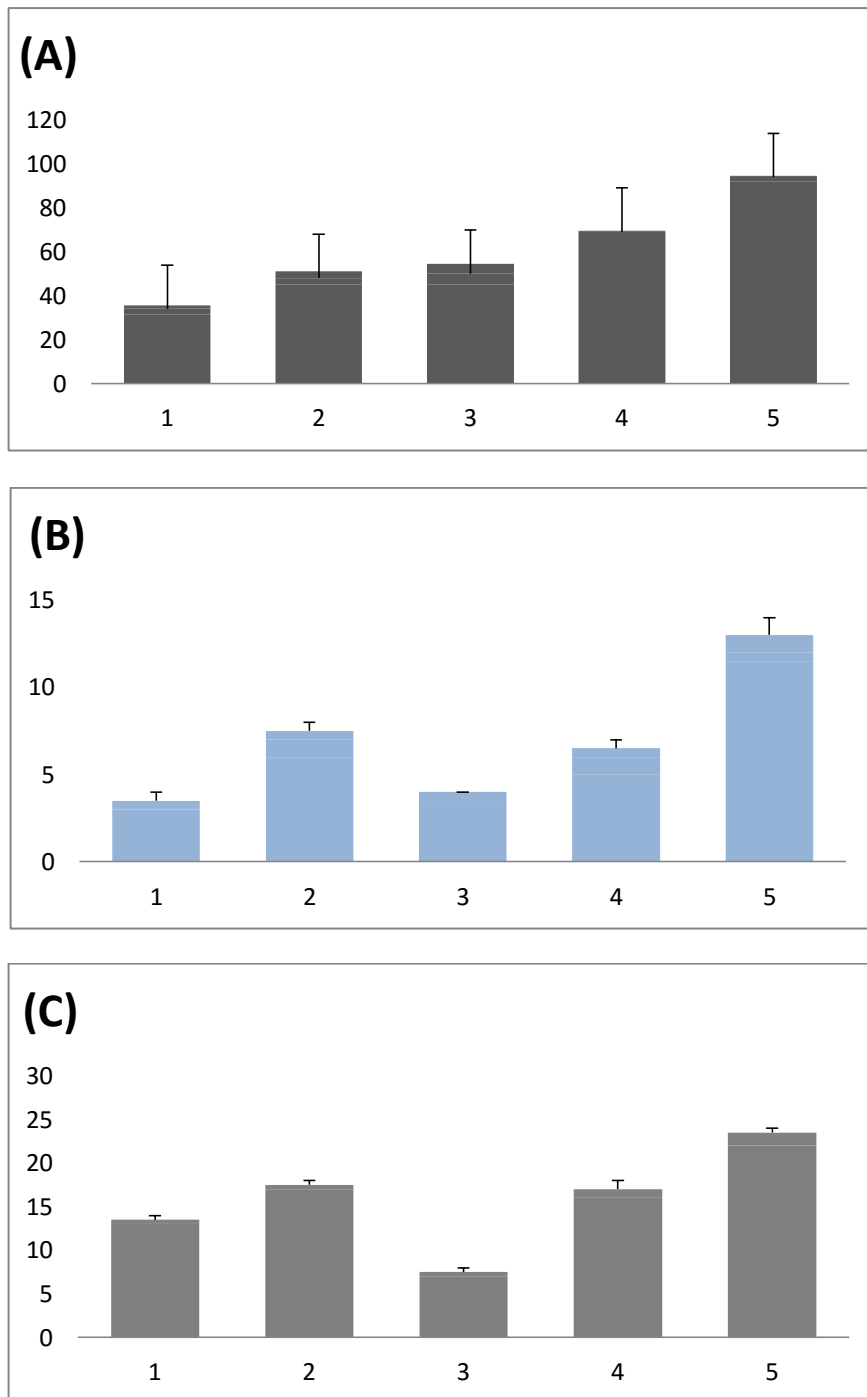
B	CZP	C1	C2	C3
4	8	4	7	12
2	5	4	6	11
3	7	3	4	14

Elaborado por: (Orna, 2015)

**Tabla 12-3.** Número total de entradas en el laberinto. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).

B	CZP	C1	C2	C3
13	17	7	16	24
11	17	8	18	21
14	18	6	16	23

Elaborado por: (Orna, 2015)



**Figura 10-3.** Efecto del extracto etanólico resuspendido en polietilenglicol, obtenido de las partes aéreas de Canayuyo (*Sonchus oleraceus*), evaluado en el modelo EPM.  
 Elaborado por: (Orma, 2015)

Los parámetros considerados para el análisis del efecto ansiolítico en el modelo EPM son: el tiempo total de permanencia en los brazos abiertos (A), número de entradas en los brazos abiertos (B) y número total de entradas a los brazos (C). Los grupos analizados constituyen Blanco (1), Clonazepam (2), Concentración 30mg/kg de planta (3), concentración 100mg/kg de planta (4) y concentración 300 mg/kg de planta (5).

### 3.7.1.1. Análisis estadístico

#### 3.7.1.1.1. Análisis de varianza del Tiempo total de permanencia en los brazos abiertos

##### One Way Analysis of Variance

jueves, agosto 06, 2015, 14:43:15

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,400)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,496)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
BLANCO	3	0	31,667	2,517	1,453
CLONAZEPAM	3	0	45,333	3,055	1,764
30 mg/kg	3	0	54,667	4,509	2,603
100 mg/kg	3	0	68,333	2,082	1,202
300 mg/kg	3	0	93,000	2,646	1,528

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	6584,933	1646,233	173,898	<0,001
Residual	10	94,667	9,467		
Total	14	6679,600			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).

Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
300 mg/kg vs. BLANCO	61,333	5	34,527	<0,001	Yes
300 mg/kg vs. CLONAZEPAM	47,667	4	26,833	<0,001	Yes
300 mg/kg vs. 30 mg/kg	38,333	3	21,579	<0,001	Yes
300 mg/kg vs. 100 mg/kg	24,667	2	13,886	<0,001	Yes
100 mg/kg vs. BLANCO	36,667	4	20,641	<0,001	Yes
100 mg/kg vs. CLONAZEPAM	23,000	3	12,948	<0,001	Yes
100 mg/kg vs. 30 mg/kg	13,667	2	7,694	<0,001	Yes
30 mg/kg vs. BLANCO	23,000	3	12,948	<0,001	Yes
30 mg/kg vs. CLONAZEPAM	9,333	2	5,254	0,004	Yes
CLONAZEPAM vs. BLANCO	13,667	2	7,694	<0,001	Yes

**3.7.1.1.2.** Análisis de varianza del número total de entradas en los brazos abiertos

**One Way Analysis of Variance**

jueves, agosto 06, 2015, 15:01:56

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Passed (P = 0,380)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0,734)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM	
BLANCO	3	0	3,000	1,000	0,577	
CLONAZEPAM	3	0	6,667	1,528	0,882	0,882
30 mg/kg	3	0	3,667	0,577	0,333	
100 mg/kg	3	0	5,667	1,528	0,882	
300 mg/kg	3	0	12,333	1,528	0,882	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	164,267	41,067	24,640	<0,001
Residual	10	16,667	1,667		
Total	14	180,933			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).

Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
300 mg/kg vs. BLANCO	9,333	5	12,522	<0,001	Yes
300 mg/kg vs. 30 mg/kg	8,667	4	11,628	<0,001	Yes
300 mg/kg vs. 100 mg/kg	6,667	3	8,944	<0,001	Yes
300 mg/kg vs. CLONAZEPAM	5,667	2	7,603	<0,001	Yes
CLONAZEPAM vs. BLANCO	3,667	4	4,919	0,026	Yes
CLONAZEPAM vs. 30 mg/kg	3,000	3	4,025	0,042	Yes
CLONAZEPAM vs. 100 mg/kg	1,000	2	1,342	0,365	No
100 mg/kg vs. BLANCO	2,667	3	3,578	0,071	No
100 mg/kg vs. 30 mg/kg	2,000	2	2,683	0,087	Do Not Test
30 mg/kg vs. BLANCO	0,667	2	0,894	0,541	Do Not Test

**3.7.1.1.3. Análisis de varianza del número total de entradas en el laberinto**

**One Way Analysis of Variance**

jueves, agosto 06, 2015, 15:01:56

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Passed (P = 0,380)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0,734)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM	
BLANCO	3	0	3,000	1,000	0,577	
CLONAZEPAM	3	0	6,667	1,528	0,882	0,882
30 mg/kg	3	0	3,667	0,577	0,333	
100 mg/kg	3	0	5,667	1,528	0,882	
300 mg/kg	3	0	12,333	1,528	0,882	

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	164,267	41,067	24,640	<0,001
Residual	10	16,667	1,667		
Total	14	180,933			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).

Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
300 mg/kg vs. BLANCO	9,333	5	12,522	<0,001	Yes
300 mg/kg vs. 30 mg/kg	8,667	4	11,628	<0,001	Yes
300 mg/kg vs. 100 mg/kg	6,667	3	8,944	<0,001	Yes
300 mg/kg vs. CLONAZEPAM	5,667	2	7,603	<0,001	Yes
CLONAZEPAM vs. BLANCO	3,667	4	4,919	0,026	Yes
CLONAZEPAM vs. 30 mg/kg	3,000	3	4,025	0,042	Yes

CLONAZEPAM vs. 100 mg/kg	1,000	2	1,342	0,365	No
100 mg/kg vs. BLANCO	2,667	3	3,578	0,071	No
100 mg/kg vs. 30 mg/kg	2,000	2	2,683	0,087	Do Not Test
30 mg/kg vs. BLANCO	0,667	2	0,894	0,541	Do Not Test

Una vez se ha realizado el análisis estadístico se puede establecer que la administración del extracto hidroalcohólico resuspendido en polietilenglicol al 15% a las concentraciones de 30, 100 y 300 mg/kg incrementa significativamente la cantidad de tiempo de permanencia en los brazos abiertos del EPM, ( $p < 0.05$ ; Fig 8-3 A), comparado con el vehículo de administración. Además se puede establecer que a la concentración de 300 mg/kg existe un incremento significativo del número de entradas en los brazos abiertos ( $p < 0.05$ ; Fig 8-3 B) frente al vehículo de administración. En el análisis del número de entradas totales (brazos abiertos y cerrados) se comprueba que a la concentración de 300 mg/kg existe un incremento significativo del número de entradas totales frente al blanco ( $p < 0.05$ ; Fig 8-3 C) lo cual establece una mayor capacidad de movilidad como experimentación de los animales a esta concentración. Similarmente los animales tratados con clonazepam (0,5mg/kg) demostraron un incremento significativo en el número de entradas y en tiempo de permanencia en los brazos abiertos, comparado con el control.

### 3.7.2. *Ensayo de campo abierto (OFT)*

**Tabla 13-3.** Número total de entradas en el centro del modelo. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).

<b>B</b>	<b>CZP</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>
4	12	4	6	9
4	11	5	7	8
5	12	4	8	9

Elaborado por: (Orna, 2015)

**Tabla 14-3.** Número total de entradas a la periferie del modelo. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).

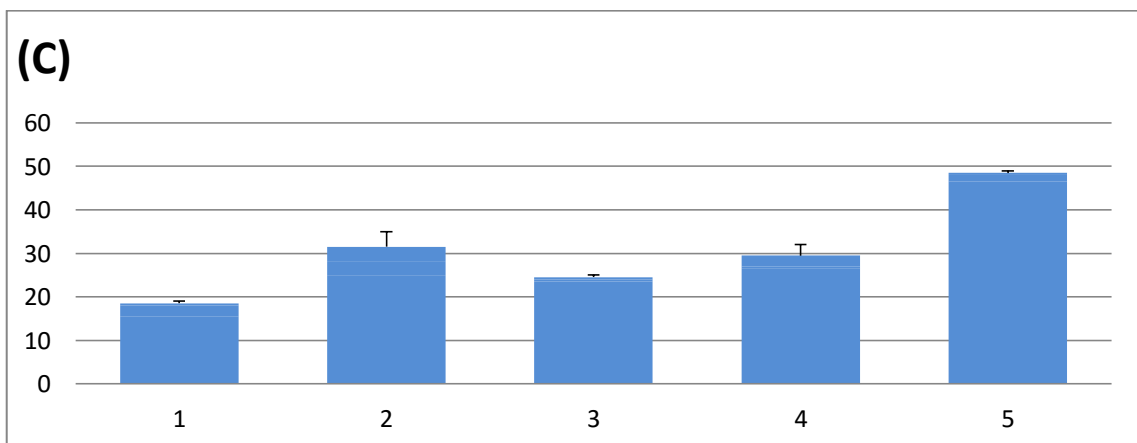
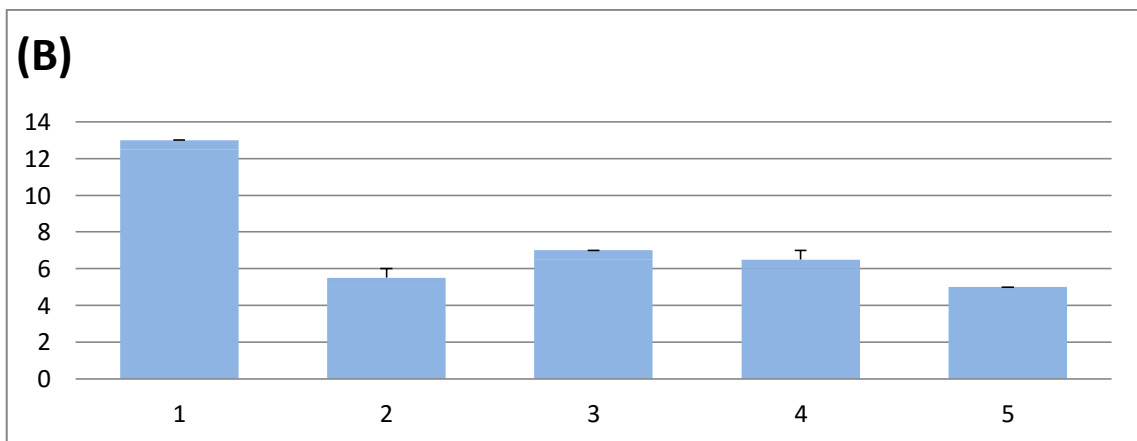
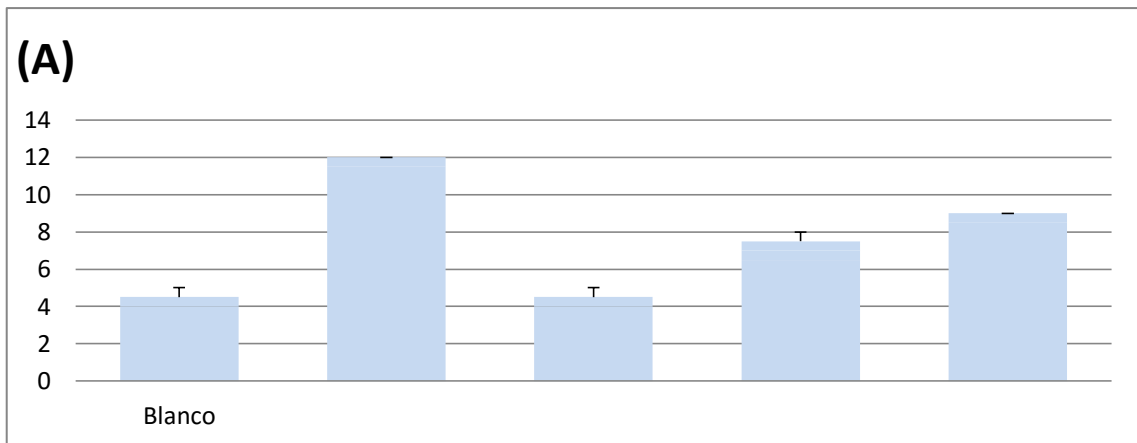
<b>B</b>	<b>CZP</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>
13	5	7	6	5
12	5	7	7	5
13	6	8	6	5

Elaborado por: (Orna, 2015)

**Tabla 15-3.** Tiempo total de permanencia en la zona central. Blanco (B), control positivo clonazepam 0 (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).

<b>B</b>	<b>CZP</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>
18	22	24	26	49
19	35	25	27	45
13	28	23	32	48

Elaborado por: (Orna, 2015)



**Figura 11-3.** Efecto del extracto etanólico resuspendido en polietilenglicol, obtenido de las partes aéreas de Canayuyo (*Sonchus oleraceus*), evaluado en el modelo OFT.  
 Elaborado por: (Orna, 2015)

Los parámetros considerados para el análisis del efecto ansiolítico en el modelo OFT son: el número de entradas en el centro (A), número de entradas en la periferie (B) y tiempo total en el seno de la zona central (C). Los grupos analizados constituyen Blanco (1), Clonazepam (2), Concentración 30mg/kg de planta (3), concentración 100mg/kg de planta (4) y concentración 300 mg/kg de planta (5).



### 3.7.2.1. Análisis estadístico

#### 3.7.2.1.1. Análisis de varianza del número de entradas a la zona central del modelo

##### One Way Analysis of Variance

jueves, agosto 06, 2015, 16:06:30

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,537)

Equal Variance Test: Passed (P = 1,000)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
BLANCO	3	0	4,333	0,577	0,333
CLONAZEPAM	3	0	11,667	0,577	0,333
30 mg/kg	3	0	4,333	0,577	0,333
100 mg/kg	3	0	7,000	1,000	0,577
300 mg/kg	3	0	8,667	0,577	0,333

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	115,733	28,933	62,000	<0,001
Residual	10	4,667	0,467		
Total	14	120,400			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).

Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
CLONAZEPAM vs. 30 mg/kg	7,333	5	18,593	<0,001	Yes
CLONAZEPAM vs. BLANCO	7,333	4	18,593	<0,001	Yes
CLONAZEPAM vs. 100 mg/kg	4,667	3	11,832	<0,001	Yes
CLONAZEPAM vs. 300 mg/kg	3,000	2	7,606	<0,001	Yes
300 mg/kg vs. 30 mg/kg	4,333	4	10,987	<0,001	Yes
300 mg/kg vs. BLANCO	4,333	3	10,987	<0,001	Yes
300 mg/kg vs. 100 mg/kg	1,667	2	4,226	0,014	Yes

100 mg/kg vs. 30 mg/kg	2,667	3	6,761	0,002	Yes
100 mg/kg vs. BLANCO	2,667	2	6,761	<0,001	Yes
BLANCO vs. 30 mg/kg	0,000	2	0,000	1,000	No

**3.7.2.1.2.** Análisis de varianza del número de entradas a la periferie del modelo

**One Way Analysis of Variance**

jueves, agosto 06, 2015, 16:08:54

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

**Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks**

jueves, agosto 06, 2015, 16:08:54

**Data source:** Data 1 in Notebook1

<b>Group</b>	<b>N</b>	<b>Missing</b>	<b>Median</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>
BLANCO	3	0	13,000	12,000	13,000
CLONAZEPAM	3	0	5,000	5,000	6,000
30 mg/kg	3	0	7,000	7,000	8,000
100 mg/kg	3	0	6,000	6,000	7,000
300 mg/kg	3	0	5,000	5,000	6,000

H = 12,238 with 4 degrees of freedom. (P = 0,016)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,016)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Ranks</b>	<b>q</b>	<b>P&lt;0,05</b>
BLANCO vs 300 mg/kg	30,500	3,938	Yes
BLANCO vs CLONAZEPAM	30,500	4,884	Yes
BLANCO vs 100 mg/kg	19,000	4,006	Yes

BLANCO vs 30 mg/kg	10,000	3,086	Yes
30 mg/kg vs 300 mg/kg	20,500	3,283	No
30 mg/kg vs CLONAZEPAM	20,500	4,322	Do Not Test
30 mg/kg vs 100 mg/kg	9,000	2,777	Do Not Test
100 mg/kg vs 300 mg/kg	11,500	2,424	Do Not Test
100 mg/kg vs CLONAZEPAM	11,500	3,549	Do Not Test
CLONAZEPAM vs 300 mg/kg	0,000	0,000	Do Not Test

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

### 3.7.2.1.3. Análisis de varianza del tiempo de permanencia en la zona central del modelo

#### One Way Analysis of Variance

jueves, agosto 06, 2015, 16:09:37

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,997)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,190)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
BLANCO	3	0	16,667	3,215	1,856
CLONAZEPAM	3	0	28,333	6,506	3,756
30 mg/kg	3	0	24,000	1,000	0,577
100 mg/kg	3	0	28,333	3,215	1,856
300 mg/kg	3	0	47,333	2,082	1,202

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	1542,267	385,567	28,212	<0,001
Residual	10	136,667	13,667		
Total	14	1678,933			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).

Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparisons for factor:

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,050</b>
300 mg/kg vs. BLANCO	30,667	5	14,368	<0,001	Yes
300 mg/kg vs. 30 mg/kg	23,333	4	10,932	<0,001	Yes
300 mg/kg vs. 100 mg/kg	19,000	3	8,902	<0,001	Yes
300 mg/kg vs. CLONAZEPAM	19,000	2	8,902	<0,001	Yes
CLONAZEPAM vs. BLANCO	11,667	4	5,466	0,014	Yes
CLONAZEPAM vs. 30 mg/kg	4,333	3	2,030	0,361	No
CLONAZEPAM vs. 100 mg/kg	0,000	2	0,000	1,000	Do Not Test
100 mg/kg vs. BLANCO	11,667	3	5,466	0,008	Yes
100 mg/kg vs. 30 mg/kg	4,333	2	2,030	0,182	Do Not Test
30 mg/kg vs. BLANCO	7,333	2	3,436	0,036	Yes

Los resultados del ensayo de campo abierto son mostrados en la Fig. 9-3. El análisis ANOVA demuestra una diferencia entre grupos, concluyendo un efecto significativo del tratamiento sobre el número de entradas a la zona central y el tiempo de permanencia en la misma para cada una de las concentraciones de estudio y así también para clonazepam (droga estándar; 0,5 mg/kg). Además el análisis demuestra que las diferentes concentraciones del extracto y la dosis de clonazepam muestran un incremento significativo frente al blanco al analizar el tiempo total de permanencia en la zona central. ( $p < 0.05$ ; Fig 9-3 C). Los resultados avalan el criterio de un efecto antitímotático, evidenciado mediante el incremento de la actividad locomotora en la parte central del campo abierto. En cuanto al número de entradas en la periferie del modelo se puede decir que no existe diferencia significativa entre los grupos experimentales y el control positivo, pero si existe una diferencia significativa entre cada una de las muestras de ensayo y el control positivo frente al control blanco o vehículo polietilenglicol 15%, estableciendo un mayor cantidad de entradas en esta zona para el blanco, lo cual verifica una menor actividad motora en el centro.

### **3.7.3. Evaluación de la actividad Gabaérgica en el modelo EPM**

Como mencionó anteriormente la actividad sobre los receptores GABA se estudia frente al modelo de ansiedad anteriormente estudiado, con la diferencia puntual de la administración del antagonista GABA Flumazenil a una concentración de 1mg/kg administrado vía intraperitoneal 15 minutos después del tratamiento oral. Se evalúan los mismos modelos animales con la finalidad de establecer la actividad a estimulante alostérica de los compuestos de ensayo.

**Tabla 16-3.** Tiempo total de permanencia en los brazos abiertos. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).\*(Administración de Flumazenil a una concentración de 1mg/kg).

B*	CZP*	C1*	C2*	C3*
12	4	30	34	36
19	4	19	28	32
10	5	18	27	33

Elaborado por: (Orna, 2015)

**Tabla 17-3.** Número total de entradas en los brazos abiertos. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).\*(Administración de Flumazenil a una concentración de 1mg/kg).

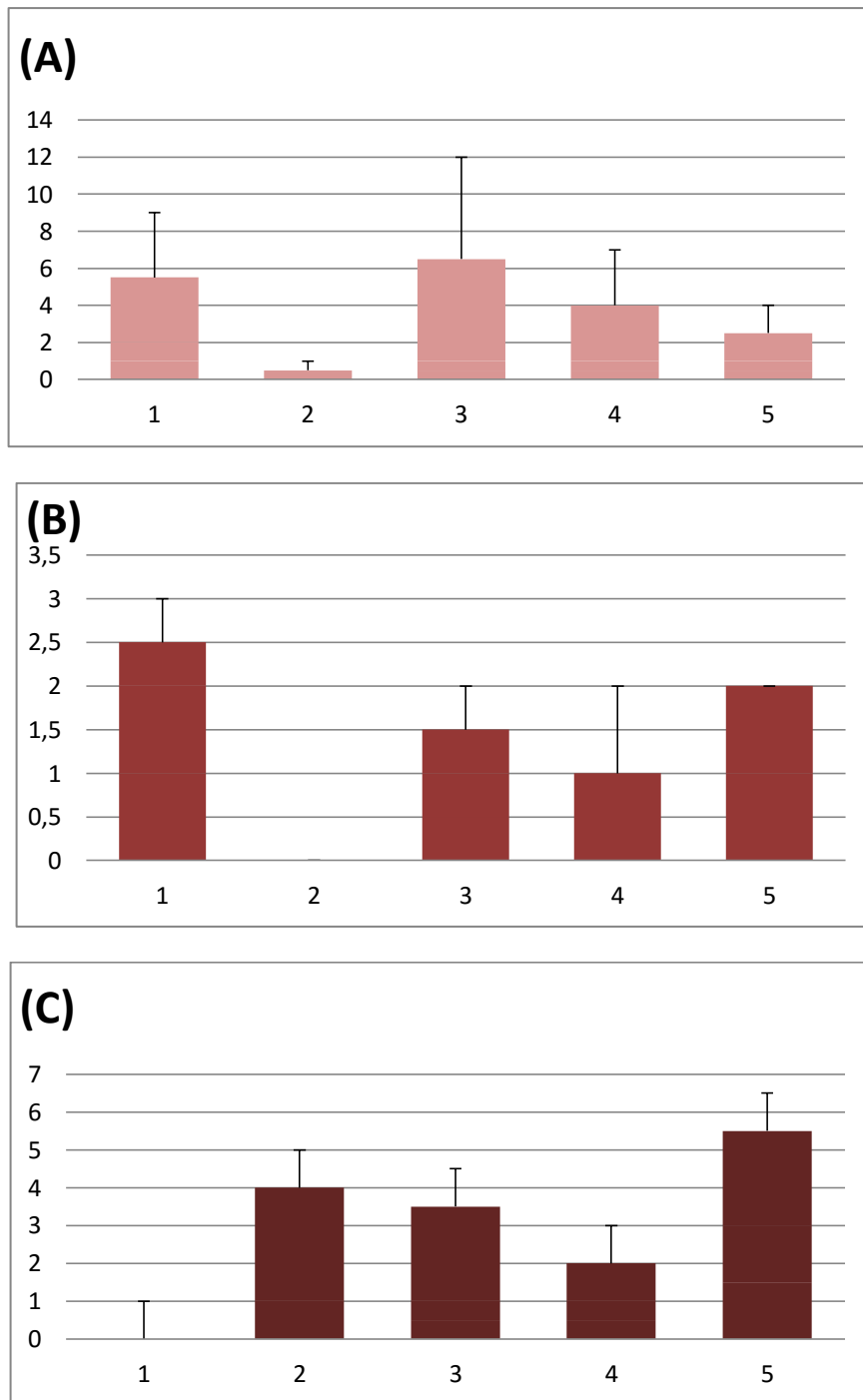
B*	CZP*	C1*	C2*	C3*
3	1	3	3	5
4	1	2	5	3
1	1	1	3	5

Elaborado por: (Orna, 2015)

**Tabla 18-3.** Tiempo total de permanencia en la zona central. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).\*(Administración de Flumazenil a una concentración de 1mg/kg).

B*	CZP*	C1*	C2*	C3*
9	6	17	9	15
9	2	12	12	7
9	0	11	10	10

Elaborado por: (Orna, 2015)



**Figura 12-3.** Evaluación del efecto Gabaérgico del extracto etanólico resuspendido en polietilenglicol, estudiado frente a un control negativo (Flumazenil), evaluado en el modelo EPM.

Elaborado por: (Orna, 2015)

Los parámetros considerados para el análisis del efecto gabaérgico en el modelo EPM son: el tiempo total de permanencia en los brazos abiertos(A), número de entradas en los brazos abiertos (B) y número total de entradas a los brazos (C). Los grupos analizados constituyen Blanco (1), Clonazepam (2), Concentración 30mg/kg de planta (3), concentración 100mg/kg de planta (4) y concentración 300 mg/kg de planta (5).

### 3.7.3.1. Análisis estadístico

#### 3.7.3.1.1. Análisis de varianza del Tiempo total de permanencia en los brazos abiertos

##### One Way Analysis of Variance

jueves, agosto 06, 2015, 16:25:07

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,143)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,741)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
BLANCO	3	0	13,667	4,726	2,728
CLONAZEPAM	3	0	20,000	4,333	0,577
30 mg/kg	3	0	22,333	6,658	3,844
100 mg/kg	3	0	29,667	3,786	2,186
300 mg/kg	3	0	33,667	2,082	1,202

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	1705,600	426,400	24,887	<0,001
Residual	10	171,333	17,133		
Total	14	1876,933			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).

Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
300 mg/kg vs. CLONAZEPAM	29,333	5	12,274	<0,001	Yes
300 mg/kg vs. BLANCO	20,000	4	8,369	<0,001	Yes
300 mg/kg vs. 30 mg/kg	11,333	3	4,742	0,018	Yes
300 mg/kg vs. 100 mg/kg	4,000	2	1,674	0,264	No
100 mg/kg vs. CLONAZEPAM	25,333	4	10,601	<0,001	Yes

100 mg/kg vs. BLANCO	16,000	3	6,695	0,002	Yes
100 mg/kg vs. 30 mg/kg	7,333	2	3,069	0,055	No
30 mg/kg vs. CLONAZEPAM	18,000	3	7,532	0,001	Yes
30 mg/kg vs. BLANCO	8,667	2	3,627	0,028	Yes
BLANCO vs. CLONAZEPAM	9,333	2	3,905	0,020	Yes

**3.7.3.1.2.** Análisis de varianza del número de entradas en los brazos abiertos

**One Way Analysis of Variance**

jueves, agosto 06, 2015, 16:26:00

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Passed (P = 0,612)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0,184)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
BLANCO	3	0	2,667	1,528	0,882
CLONAZEPAM	3	0	1,000	1,000	0,000
30 mg/kg	3	0	2,000	1,000	0,577
100 mg/kg	3	0	3,667	1,155	0,667
300 mg/kg	3	0	4,333	1,155	0,667

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	20,933	5,233	4,361	0,027
Residual	10	12,000	1,200		
Total	14	32,933			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,027).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,635

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
------------	---------------	---	---	---	---------



300 mg/kg vs. CLONAZEPAM	3,333	5	5,270	0,026	Yes
300 mg/kg vs. 30 mg/kg	2,333	4	3,689	0,102	No
300 mg/kg vs. BLANCO	1,667	3	2,635	0,200	Do Not Test
300 mg/kg vs. 100 mg/kg	0,667	2	1,054	0,473	Do Not Test
100 mg/kg vs. CLONAZEPAM	2,667	4	4,216	0,057	No
100 mg/kg vs. 30 mg/kg	1,667	3	2,635	0,200	Do Not Test
100 mg/kg vs. BLANCO	1,000	2	1,581	0,290	Do Not Test
BLANCO vs. CLONAZEPAM	1,667	3	2,635	0,200	Do Not Test
BLANCO vs. 30 mg/kg	0,667	2	1,054	0,473	Do Not Test
30 mg/kg vs. CLONAZEPAM	1,000	2	1,581	0,290	Do Not Test

### 3.7.3.1.3. Análisis de varianza del número de entradas totales en el laberinto

#### One Way Analysis of Variance

jueves, agosto 06, 2015, 16:27:04

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,304)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,609)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
BLANCO	3	0	9,000	0,000	0,000
CLONAZEPAM	3	0	2,667	3,055	1,764
30 mg/kg	3	0	13,333	3,215	1,856
100 mg/kg	3	0	10,333	1,528	0,882
300 mg/kg	3	0	10,667	4,041	2,333

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	189,733	47,433	6,187	0,009
Residual	10	76,667	7,667		
Total	14	266,400			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,009).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,839

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparisons for factor:

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,050</b>
30 mg/kg vs. CLONAZEPAM	10,667	5	6,672	0,006	Yes
30 mg/kg vs. BLANCO	4,333	4	2,711	0,281	No
30 mg/kg vs. 100 mg/kg	3,000	3	1,877	0,413	Do Not Test
30 mg/kg vs. 300 mg/kg	2,667	2	1,668	0,266	Do Not Test
300 mg/kg vs. CLONAZEPAM	8,000	4	5,004	0,023	Yes
300 mg/kg vs. BLANCO	1,667	3	1,043	0,748	Do Not Test
300 mg/kg vs. 100 mg/kg	0,333	2	0,209	0,886	Do Not Test
100mg/kg vs. CLONAZEPAM	7,667	3	4,796	0,017	Yes
100 mg/kg vs. BLANCO	1,333	2	0,834	0,569	Do Not Test
BLANCO vs. CLONAZEPAM	6,333	2	3,962	0,019	Yes

Los resultados del ensayo de laberinto en cruz elevado para el estudio de la actividad gabaérgica demuestran que hay una diferencia significativa en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos de los grupos de estudio y el control positivo frente al Blanco (polietilenglicol 15%) ( $p < 0,05$ ; fig 10-3 A), pero no existe diferencia significativa entre el grupo 5 y el 4 ( $p = 0,264$ ) y los grupos 4 y 3 ( $p = 0,055$ ). Es notable que el Flumazenil un agonista inverso GABA<sub>A</sub> deniega la acción de las benzodiazepinas, debido a su mecanismo de acción como agonista inverso inotrópico neutraliza los efectos del clonazepam, y esto queda demostrado en la fig 4-9 A en donde se evidencia un decrecimiento significativo del tiempo de permanencia en los brazos abiertos frente al blanco; también se puede evidenciar una diferencia significativa a las concentraciones de 100 y 300 mg/kg de planta en las cuales se también se ve reducido el tiempo de permanencia en los brazos abiertos, es importante señalar que la actividad mostrada no es la misma que la presentada por clonazepam aún se puede deducir que existe aparentemente la actividad Gabaérgica. Debido a que existen al menos 3 compuestos con posible actividad ansiolítica (apigenina, luteolina y quercetina) es imposible descartar cuál de ellos no cumple una actividad Gabaérgica, debido a este sinergismo de flavonoides es posible que los efectos antagonista gabaérgico-ansiolítico sean contrarrestados entre sí.

El número de entradas a los brazos abiertos para el grupo 2 (clonazepam) es prácticamente nulo como es de esperar por el efecto del Flumazenil. No existe diferencias significativas entre los grupos de ensayo y el blanco ( $p > 0,05$ ; fig. 10-3 B), mientras el único grupo que presenta una

diferencia relevante frente al control positivo es el grupo 5 (300mg/kg), lo que demostraría que ha esta concentración el efecto GABA es menor aparentemente.

Por último la actividad locomotora medida como el total de entradas en ambos brazos establece existe una mayor actividad de los grupos de ensayo frente al control positivo, lo que quiere decir que es notable una mayor actividad, principalmente a la concentración de 300 mg/kg.

### 3.7.4. Evaluación de la actividad Gabaérgica en el modelo OFT

**Tabla 19-3.** Número total de entradas en el centro del modelo. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).\*(Administración de Flumazenil a una concentración de 1mg/kg).

B*	CZP*	C1*	C2*	C3*
12	12	5	6	3
8	6	1	7	2
5	6	3	8	3

Elaborado por: (Orna, 2015)

**Tabla 20-3.** Número total de entradas a la periferie del modelo. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).\*(Administración de Flumazenil a una concentración de 1mg/kg).

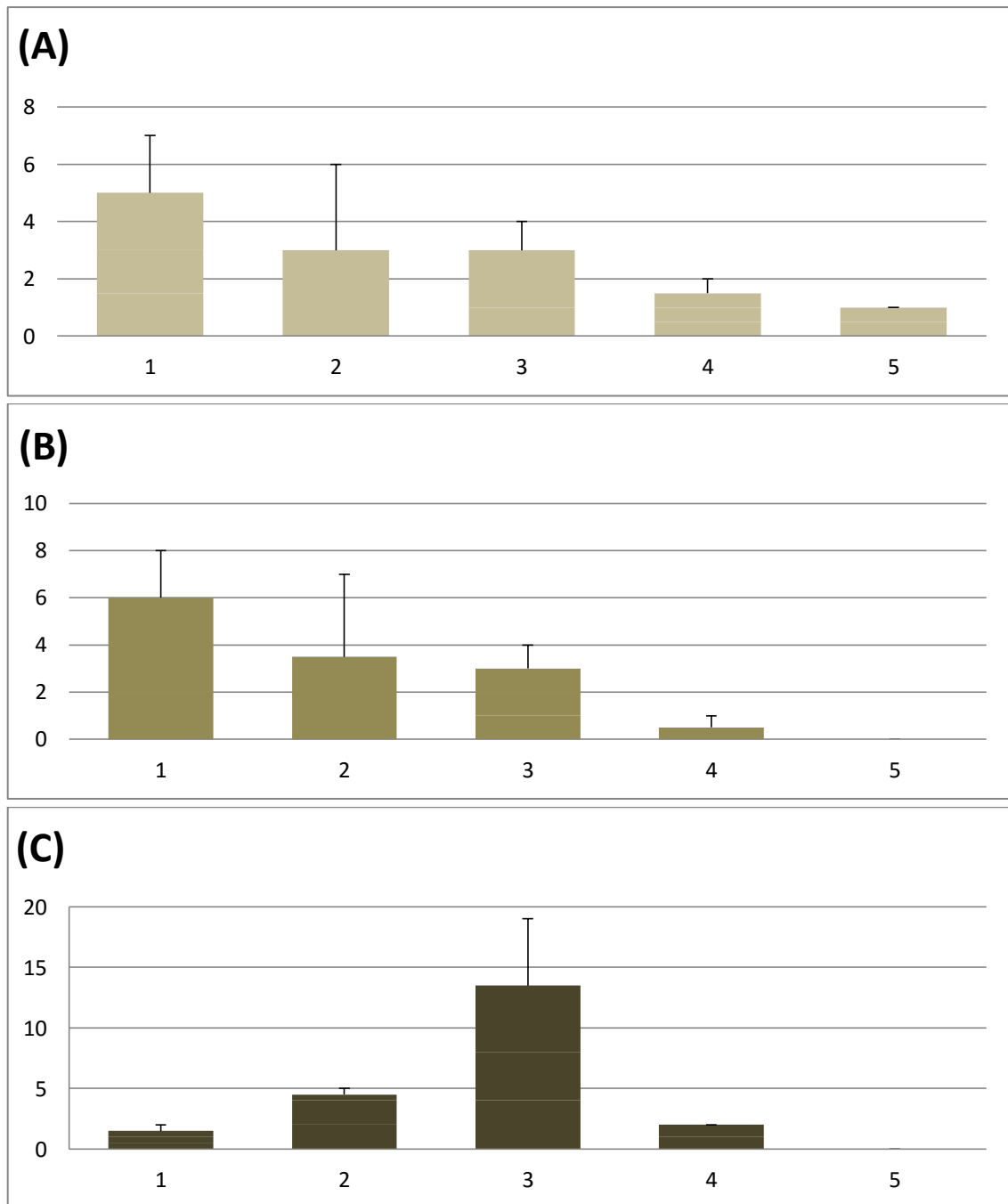
B*	CZP*	C1*	C2*	C3*
13	13	6	5	5
9	6	2	5	5
5	6	4	6	5

Elaborado por: (Orna, 2015)

**Tabla 21-3.** Tiempo total de permanencia en la zona central. Blanco (B), control positivo clonazepam (CZP), concentración 1 (C1), concentración 2 (C2), concentración 3 (C3).\*(Administración de Flumazenil a una concentración de 1mg/kg).

B*	CZP*	C1*	C2*	C3*
24	22	23	17	9
25	23	4	15	9
23	18	12	17	9

Elaborado por: (Orna, 2015)



**Figura 11-3.** Evaluación del efecto Gabaérgico del extracto etanólico resuspendido en polietilenglicol, estudiado frente a un control negativo (Flumazenil), evaluado en el modelo OFT

Elaborado por: (Orna, 2015)

Los parámetros considerados para el análisis del efecto gabaérgico en el modelo OFT son: el número total de entradas en el centro (A), número de entradas en la periferie (B) y tiempo total en el seno de la zona central (C). Los grupos analizados constituyen Blanco (1), Clonazepam (2), Concentración 30mg/kg de planta (3), concentración 100mg/kg de planta (4) y concentración 300 mg/kg de planta (5).

### 3.7.4.1. Análisis estadístico

#### 3.7.4.1.1. Análisis de varianza del número de entradas a la zona central del modelo

##### One Way Analysis of Variance

jueves, agosto 06, 2015, 16:30:50

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Shapiro-Wilk) Passed (P = 0,473)

Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

##### Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

jueves, agosto 06, 2015, 16:30:50

Data source: Data 1 in Notebook1

Group	N	Missing	Median	25%	75%	
BLANCO	3	0	8,000	5,000	12,000	
CLONAZEPAM	3	0	0	6,000	6,000	12,000
30 mg/kg	3	0	3,000	1,000	5,000	
100 mg/kg	3	0	7,000	6,000	8,000	
300 mg/kg	3	0	3,000	2,000	3,000	

H = 9,979 with 4 degrees of freedom. (P = 0,041)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,041)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0,05
BLANCO vs 300 mg/kg	23,500	3,034	No
BLANCO vs 30 mg/kg	22,000	3,523	Do Not Test

BLANCO vs 100 mg/kg	1,000	0,211	Do Not Test
BLANCO vs CLONAZEPAM	1,000	0,309	Do Not Test
CLONAZEPAM vs 300 mg/kg	22,500	3,603	Do Not Test
CLONAZEPAM vs 30 mg/kg	21,000	4,427	Do Not Test
CLONAZEPAM vs 100 mg/kg	0,000	0,000	Do Not Test
100 mg/kg vs 300 mg/kg	22,500	4,743	Do Not Test
100 mg/kg vs 30 mg/kg	21,000	6,481	Do Not Test
30 mg/kg vs 300 mg/kg	1,500	0,463	Do Not Test

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

### 3.7.4.1.2. Análisis de varianza del número de entradas a la periferie del modelo

#### One Way Analysis of Variance

jueves, agosto 06, 2015, 16:31:28

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Passed (P = 0,192)

**Equal Variance Test:** Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

#### Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

jueves, agosto 06, 2015, 16:31:28

**Data source:** Data 1 in Notebook1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
BLANCO	3	0	9,000	5,000	13,000
CLONAZEPAM	3	0	6,000	6,000	13,000
30 mg/kg	3	0	4,000	2,000	6,000
100 mg/kg	3	0	5,000	5,000	6,000
300 mg/kg	3	0	5,000	5,000	5,000

H = 7,009 with 4 degrees of freedom. (P = 0,135)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,135)

**3.7.4.1.3.** Análisis de varianza del tiempo de permanencia total en la zona central del modelo

**One Way Analysis of Variance**

jueves, agosto 06, 2015, 16:32:24

**Data source:** Data 1 in Notebook1

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

**Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks**

jueves, agosto 06, 2015, 16:32:24

**Data source:** Data 1 in Notebook1

<b>Group</b>	<b>N</b>	<b>Missing</b>	<b>Median</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>
BLANCO	3	0	24,000	23,000	25,000
CLONAZEPAM	3	0	22,000	18,000	23,000
30 mg/kg	3	0	12,000	4,000	23,000
100 mg/kg	3	0	17,000	15,000	17,000
300 mg/kg	3	0	9,000	9,000	9,000

H = 10,299 with 4 degrees of freedom. (P = 0,036)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,036)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

**Comparison**                      **Diff of Ranks**      **q**      **P<0,05**



BLANCO vs 300 mg/kg	32,000	4,131	Yes
BLANCO vs 30 mg/kg	23,000	3,683	Yes
BLANCO vs 100 mg/kg	20,000	4,216	Yes
BLANCO vs CLONAZEPAM	10,000	3,086	Yes
CLONAZEPAM vs 300 mg/kg	22,000	3,523	No
CLONAZEPAM vs 30 mg/kg	13,000	2,741	Do Not Test
CLONAZEPAM vs 100 mg/kg	10,000	3,086	Do Not Test
100 mg/kg vs 300 mg/kg	12,000	2,530	Do Not Test
100 mg/kg vs 30 mg/kg	3,000	0,926	Do Not Test
30 mg/kg vs 300 mg/kg	9,000	2,777	Do Not Test

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

En el análisis de varianza Kruskal-Wallis se demuestra que con un 95% de confianza existe diferencia significativa entre los grupos de estudio. Aun así no existen diferencias significativas entre el número de entradas a la zona central de los grupos de estudio frente al blanco, tampoco frente al control positivo.

En el análisis del número de entradas a la periferia no se encuentra diferencias entre grupos lo que quiere decir que para el ensayo de campo abierto la acción del Flumazenil se ve reducida.

En el análisis correspondiente al tiempo de permanencia en la zona central del modelo animal se establece que existe una diferencia significativa entre los 3 grupos de estudio y el control positivo frente al blanco de ensayo ( $p < 0,05$ ; fig 11-3 C), en el cual se establece que estos grupos tienen mayor locomoción en la zona central que el blanco, aunque debería esperarse que la locomoción sea igual o menor.

Por último es importante recalcar que el efecto sobre los receptores GABA no queda lo suficientemente claro, por lo que es necesario realizar una mayor cantidad de estudios en esta línea que nos permitan elucidar la actividad específica de los diferentes extractos estudiados sobre el SNC.

## CONCLUSIONES

En las partes aéreas del Canayuyo (*Sonchus oleraceus*) se pudo identificar la presencia de metabolitos secundarios del tipo lactonas, triterpenos, resinas, azúcares reductores, compuestos fenólicos y flavonoides.

Se determinó presencia de flavonoides tipo apigenina y luteolina mediante TLC debido al elucidar un compuesto de características roza anaranjado visto al UV que por características de similaridad estructural por este procedimiento no se pudo diferenciar entre ambas flavonas.

Se evaluó la actividad citotóxica en neutrófilos aislados en el cual se demostró una toxicidad total a una concentración de 200ppm de flavonoides totales; mientras el ensayo de toxicidad en *Artemia salina* no fue factible para este estudio por presencia de compuestos intrínsecos letales para esta especie de crustáceo.

Mediante cromatografía líquida de alta eficiencia se cuantificó 0,4133% de apigenina; 1,4123% de luteolina y 0,8536% de quercetina; que sumado brindan un resultado de 2,6792% de flavonoides totales.

En el análisis *in vivo* se demuestra la actividad ansiolítica de las 3 concentraciones del extracto hidroalcohólico en el ensayo de laberinto en cruz considerando la variable “tiempo de permanencia en brazos abiertos”, la concentración 300mg/kg demuestra ser la mejor concentración con mayor actividad frente al blanco y al control positivo en las tres variables consideradas “tiempo de permanencia en los brazos abiertos”, “número de entradas en los brazos abiertos” y “número de entradas totales”. En el modelo OFT se demuestra un efecto antitímotático, evidenciado mediante el incremento de la actividad locomotora en la parte central del campo abierto; la concentración 300mg/kg demuestra ser la mejor concentración debido a presentar un mayor número de permanencia en el centro del campo con diferencia significativa frente a los demás grupos.

## RECOMENDACIONES

Para el análisis *in vivo* se recomienda a las autoridades pertinentes adquirir equipo necesario para la evaluación conductual, principalmente cámaras detectoras de movimiento y distancia.

Después de haber analizado los inconvenientes de estudiar la citotoxicidad en neutrófilos aislados con extractos de flavonoides se recomienda a quien corresponda elaborar una línea de investigación considerando un tema de estudio para la “Validación del método de citotoxicidad en neutrófilos aislados para extractos de plantas”; considerando que el método utilizado es espectrofotométrico y existen interferencias y errores analíticos e instrumentales de análisis con extractos de plantas que poseen en su composición flavonoides, que como es de conocimiento fitoquímico presentan color característico en función del tipo de compuesto, los cuales interfieren en menor o mayor medida con las medidas de absorbancia.

## GLOSARIO

<b><math>\lambda</math></b>	Longitud de onda
<b>A</b>	Absorbancia
<b>Ac</b>	Ácido
<b>%</b>	Porcentaje
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>CCFP</b>	Cromatografía en capa fina preparativa
<b>Citotóxico</b>	Tóxico a células
<b>cm</b>	Centímetros
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EPM</b>	Laberinto en cruz elevado (Elevated plus-maze)
<b>g</b>	Gramos
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta eficiencia (High performance liquid chromatography)
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>L</b>	Litro
<b>mg</b>	Miligramo
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>MSH</b>	Solución balanceada de Hank's
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>OFT</b>	Ensayo de campo abierto (Open Field Test)
<b>ppm</b>	Parte por millón $\mu\text{g}/\text{ml}$
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>Rf</b>	Ratio of Front (posición de un compuesto en la placa de cromatografía en capa fina)

<b>SM</b>	Solución madre
<b>TLC</b>	Thin Layer Chromatography
<b>T</b>	Temperatura
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>WST-1</b>	Cell Proliferation Reagent

## BIBLIOGRAFÍA

**ACOSTA, A., RODRÍGUEZ, A., & LOTERO, J.** *Epidemiología de los trastornos de ansiedad y depresión de adolescentes en una población rural.* (2008). [Consulta: 18 de Octubre de 2014]. De epidemiología de los trastornos de ansiedad y depresión de adolescentes en una población rural: [http://www.med.unne.edu.ar/revista/revista184/2\\_184.pdf](http://www.med.unne.edu.ar/revista/revista184/2_184.pdf)

**CALLADO, L.** Neurofarmacología contemporánea. En Zarranz (Ed.). Barcelona: ELSEVIER, 2011, pp 71-94

**CARDOSO, F., SONCINI, R., & GIUSTI-PAIVA, A.** Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology* [En línea]. ELSEVIER, (2009), 124, 325-327 [Consulta: 15 de Marzo de 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874109002591>.

**CHEN, et al.** Pharmacokinetic study of luteolin, apigenin, chrysoeriol and diosmetin after oral administration of Flos Chrysanthemi extract in rats. *Fitoterapia*, vol. 83, (2012), pp. 1616-1622.

**Conde, & Elvira.** Contribucion al conocimiento de la Composicion polifenolica de madera, corteza y hojas de *Eucalyptus gamaldulensis*, *E. globulus* Y *E. rudis* (Tesis Doctoral). Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Madrid. 1994

**CORDOBA, et al.** *Diagnóstico y tratamiento de los trastornos de ansiedad.* Mexico, 2005, p. 7

**CRUZ-MORALES, S, et. al.** Modelos de Ansiedad. *Revista Mexicana de Análisis de Conducta* [En línea],(2003), (México) 28(1), pp. 93-105. [Consulta: 06 de Marzo de 2015]. Disponible en: <http://rmac-mx.org/wp-content/uploads/2013/05/Vol-29-n-1-93-105.pdf>.

**El Comercio.** *En la actualidad, los jóvenes experimentan cada vez más ansiedad* [En línea]. 2014. [Consulta: 18 de Octubre de 2014]. Disponible en: <http://www.elcomercio.com.ec/tendencias/actualidad-jovenes-experimentan-mas-ansiedad.html>

**ESCAMILLA.** "Trastornos de ansiedad (I). Trastorno de ansiedad generalizado. Trastorno de pánico". *Medicine*, vol. 10,nº 87, (2011), pp 5725-5733.

**REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA.** *Métodos de Farmacognosia.* Madrid-España, 2003, p. 95.

**FAE, F. A.** *Memoria, memoria... donde estas?*[En línea]. 2012. [ Consulta: 28 de Diciembre de 2014]. Disponible en: <http://familia.alzfae.org/2014/07/memoria-memoriadonde-estas/>

**FERRE, F., & CAMARILLO, L.** "Estado actual de tratamiento de ansiedad". *Medicine*, vol. 11, n° 46 (2013), (España) pp. 2747-2754.

**FESTORAZZI, A., RODRÍGUEZ, L., & LOTERO, J.** "Epidemiología de los trastornos de ansiedad y depresión en adolescentes de una población rural". *Revista de Posgrado de la Via Cátedra de Medicina*, n° 184 (2008), (Argentina) 5-8.

**FLÓREZ, J.** *Farmacología Humana* (Sexta ed.). Barcelona-España: Elsevier, pp. 543-565.

**FRECKMANN, R.** *Robert W. Freckmann Herbarium* [En línea]. 2012. [Consulta: 07 de Febrero de 2015]. Disponible en: <http://wisplants.uwsp.edu/scripts/detail.asp?SpCode=SONOLE>

**GARCÉS, S.** *Inventario de las especies vegetales en el sendero ecológico de las cascadas Jun Jun* (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato. Cevallos. 2012. pp. 40-42.

**GILMAN, & GOODMAN.** *Tratamiento farmacológico de la depresión y los trastornos de ansiedad*. En J. O'Donnell, S. Richard., L. Brunton, B. Chapner, & B. Knollmann (Editores.), *Goodman & Goodman Las bases farmacológicas de la terapéutica* (A. Higuera, A. Pérez, G. Arias, J. González, & J. Blengio, Trads., Undécima ed., México-México: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. pp 397-415

**GINER, R., et. al.** "A Chemotaxonomic Survey of Sonchus Subgenus Sonchus". *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 21, n° 05 (1993), pp. 617-620.

**GÓMEZ, C., SALDIVAR-GONZÁLEZ, A., & RODRÍGUEZ, R.** "Modelos animales para el estudio de Ansiedad: una aproximación crítica". *Salud Mental*, vol. 25, n° 1 (2002), (España) pp. 1-10.

**HERNÁNDEZ, F., et. al.** *Eficacia del extracto fluido de Passiflora incarnata L. en los trastornos de ansiedad* [En línea]. 2007 [Consulta: 12 de Marzo de 2015, de Medicentro]. Disponible en: <http://www.medicentro.sld.cu/index.php/medicentro/article/download/584/620>

**JANETA, M.** "Actividad antiinflamatoria y citotóxica in vitro de las fracciones aisladas por cromatografía preparativa en capa fina de (*Parmelina tiliácea*) "[Tesis de pregrado]. Riobamba-Ecuador. 2015. pp. 49-52.

**JMGORMAN, & OTROS.** *Hipótesis neuroanatómicas del pánico*. (Tercera ed.). Madrid-España, 2000, p. 157

**LI, H., et. al.** "Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* 'edulis' y *Passiflora edulis* 'flavicarpa'". *Journal of ethnopharmacology* [En línea], 2011, (China) (113), pp. 185-190 [Consulta: 06 de Marzo de 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887411000824X>.

**LINNAEUS, C.** "*Sonchus oleraceus* L". *Species Plantarum*, vol. 2, (1753), p. 794.

**MAMMEN, D., & MAMMEN, D.** "A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids". *FOOD chemistry*, vol. 135 (2012), pp. 1365-1368. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.05.109

**MARSIGLIA, I.** "Estudio clínico y epidemiológico de la ansiedad y la depresión en una muestra de 1159 pacientes". *Gac Méd Caracas*, vol. 118, n° 1 (2010), (Venezuela) pp. 10-12.

**MAWALAGEDERA, S. M.** Antioxidant Activities of *Sonchus Oleraceus* L. (Tesis de doctorado). University of Wellington, Estados Unidos. 2014. pp. 1-2.

**MCDOWELL, A., THOMPSON, S., STARK, M., ZQ, O., & GOULD, K.** "Antioxidant activity of puha (*Sonchus oleraceus* L.) as assessed by the cellular antioxidant activity (CAA) assay". *Phytother Re*, vol. 25, n° 12 (2012), (Estados Unidos) pp. 1876-1882.

**Ministerio de Sanidad y Consumo (España).** *Guía de Práctica Clínica para el manejo de pacientes con trastornos de Ansiedad en atención primaria* [En línea]. España, 2013. [Consulta: 18 de Octubre de 2014], Disponible en: [http://www.guiasalud.es/GPC/GPC\\_430\\_Ansiedad\\_Lain\\_Entr\\_compl.pdf](http://www.guiasalud.es/GPC/GPC_430_Ansiedad_Lain_Entr_compl.pdf)

**OEM.** *Desarrolla IMSS medicamento para tratamiento de ansiedad* [En línea]. 2009. [Consulta: 19 de Octubre de 2014]. Disponible en: <http://phytomedchile.blogspot.com/2006/04/valeriana-officinalis-un.html>

**OMS.** *Trastornos mentales y del comportamiento: Pautas diagnósticas y de actuación en atención primaria*. España. (s.f.)

**PELISSOLO.** "Trastornos de ansiedad y neuróticos". *Tratados de medicina*, vol. 16, n° 4 (2012), (España) pp 1-10.

**POLANCO, L., & VARGAS-IRWIN, C. G.** (Diciembre de 2011). "Modelos animales: Una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad". *Suma Psicológica* [En línea], vol 18 (2), pp. 141-147. [Consulta: 06 de Marzo de 2015]. ISSN 0121-4381. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/sumps/v18n2/v18n2a11>.



**PUNSET, E.** *La ansiedad, el miedo y la amígdala* [En línea]. 2008. [Consulta: 28 de Diciembre de 2014]. Disponible en: <https://diariodeltoc.wordpress.com/2008/06/10/3907/>

**RANG, & DALE.** *Farmacología* (Sexta ed.). Barcelona-España: ELSEVIER, 2008, pp. 535

**RANG, & DALE.** *Farmacología*. 7ªed. Barcelona-España: ELSEVIER, 2012, pp. 531-539

**RICHTER, L,ET. AL.** "Diazepam-bound GABAA receptor models identify new benzodiazepine binding-site ligands". *Nat Chem Biol* [En línea], 2010, 8(5), pp. 455-464. [Consulta: 01 de Enero de 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3368153/>

**RIOFRÍO, K.** *Evaluación del efecto ansiolítico del extracto hidroalcohólico de flor de taxo (Passifloratripartita var. Mollissima) en ratones (Mus musculus)* (Tesis de pregrado). ESPOCH, Riobamba: Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, 2014.

**ROJAS, E.** *La ansiedad*. Madrid: Temas de Hoy S.A. (1998)

**SÁNCHEZ, J., & ROMÁN, F.** "Amígdala, corteza prefrontal y especialización hemisférica en la experiencia y expresión emocional". *anales d psicología* [En línea], 2004 (España), 20(2), pp. 223-240. [Consulta: 28 de Diciembre de 2014]. Disponible en: [http://www.um.es/analesps/v20/v20\\_2/05-20\\_2.pdf](http://www.um.es/analesps/v20/v20_2/05-20_2.pdf)

**SCHALATTER, & GAMAZO.** "Trastornos de ansiedad (II). Fobias. Trastorno obsesivo-compulsivo". *Medicine*, vol.10, n° 85 (2011), (España) pp. 5734-5741.

**TORRES, M.** *Determinación de la actividad antioxidante de los extractos cloroformico, etanólico, y acuoso, de arrayan, calaguala, canayuyo y tipo* (Tesis de pregrado). ESPOCH, Riobamba: Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, 2014.

**VILELA, F., et. al.** "Anti-inflammatory and antipyretic effects of *Sonchus oleraceus* in rats". *J Ethnopharmacol*, vol. 127, n°3 (2010), (Estados Unidos) pp. 737-741.

**VILLAR, Á.** *Farmacognosia general*. Síntesis. (1994) pp. 72.

**VIVES, M., et. al.** "Prevalencia de trastornos mentales y factores asociados en pacientes de atención primaria mayores de 75 años". *Actas españolas de psiquiatría*, vol. 4, n°4 (2013), (España) pp. 218-226.

**XIAO, SHAO, YAN, & ZHANG.** "Measurement and correlation of solubilities of apigenin and apigenin 7-O-rhamnosylglucoside in seven solvents at different temperatures". *JCT*, vol. 43 (2011), (China) 240-243.

**XU, Y., & LIANG, J.-Y.** "Chemical Constituents of *Sonchus oleraceus* L".[J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, vol. 05, (China) pp. 7.

## ANEXOS

**Anexo A.** Espectrofotómetro Uv marca Heyios utilizado para las determinaciones de Flavonoides totales y la identificación de compuestos aislados



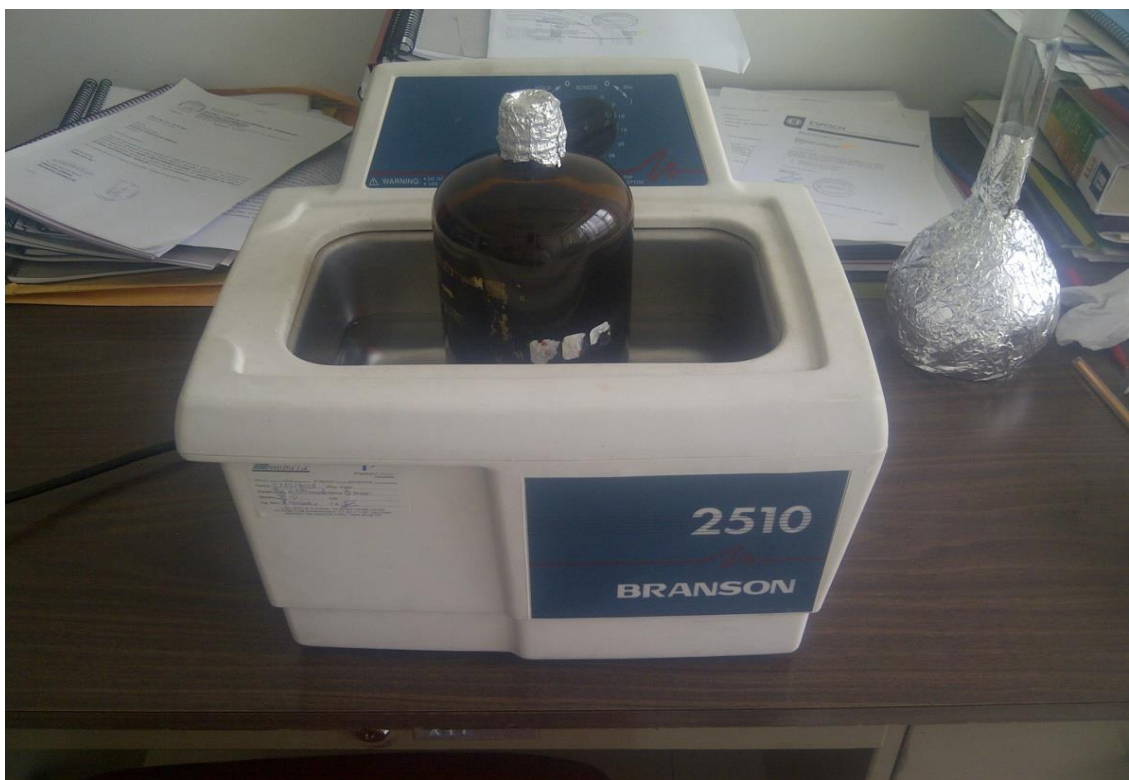
**Anexo B.** Equipo HPLC SCL CT0 10-A empleado para la cuantificación de Flavonoides.



**Anexo C.** Equipo de filtración por membrana empleado en la purificación de la fase móvil



**Anexo D.** Desionizador Branson 2510. (Desionización de la fase móvil)



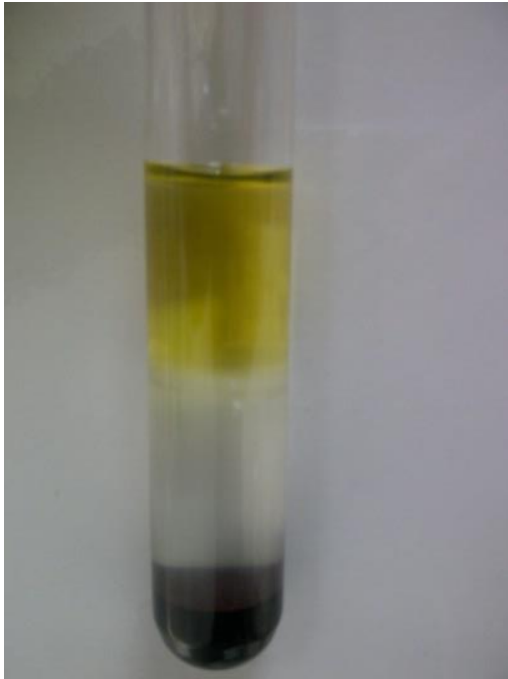
**Anexo E.** Sistema Rotavapor para concentración de extractos



**Anexo F.** Columna en Fase sólida C-18



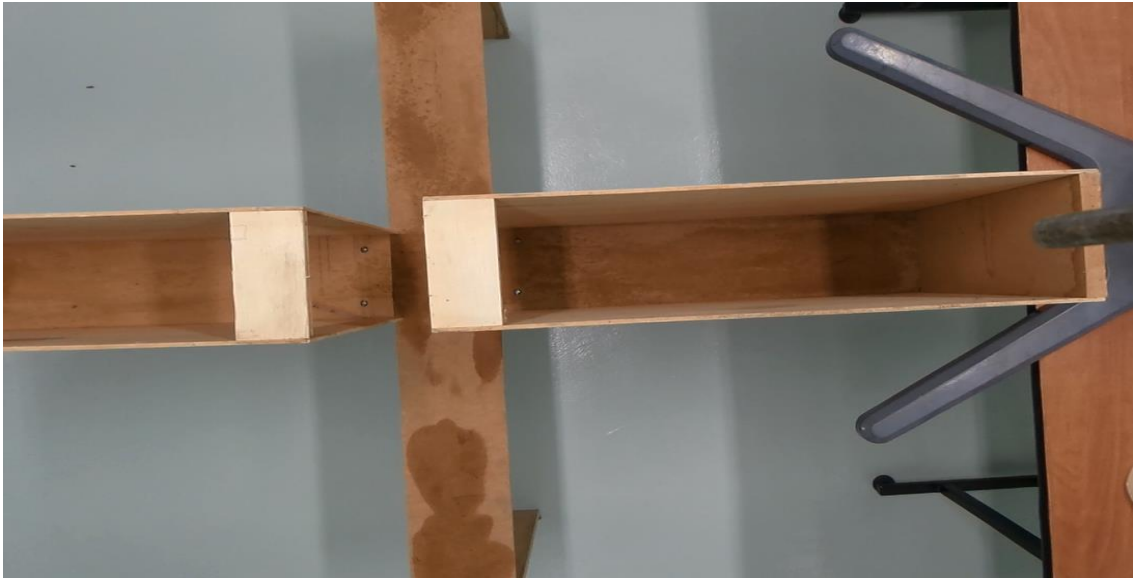
**Anexo G.** Separación de la fase mononuclear mediante Ficoll paque.



**Anexo H.** Sistema de pesaje de animales de experimentación



**Anexo I.** Modelo animal de laberinto en cruz elevado (EPM)



**Anexo J.** Modelo animal OFT o ensayo de campo abierto (no tene el fondo blanco característico y el número de cuadros de la periferie)

