



**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA**

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DE *Hypericum laricifolium* (ROMERILLO) EN RATONES (*Mus musculus*).”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL**

Presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA: MICHELE SOFÍA GODOY ESPÍN**

**TUTORA: BQF. GISELA PILCO, M.Sc**

Riobamba-Ecuador

2018

**©2018, Michele Sofía Godoy Espín**

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

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: Tipo Trabajo experimental “**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DE *Hypericum laricifolium* (ROMERILLO) EN RATONES (*Mus musculus*)**”, de responsabilidad de la señorita Michele Sofía Godoy Espín, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

**FIRMA**

**FECHA**

BQF. Gisela Pilco, M.Sc.

**DIRECTOR DE TRABAJO  
DE TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

BQF. Diego Vinuesa, M.Sc.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Yo, **Michele Sofía Godoy Espín**, declaro que el siguiente trabajo de titulación es de mi autoría, así como los resultados obtenidos son auténticos y originales. Los textos que constan en el documento provienen de fuentes externas y están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos expuestos en el trabajo de titulación.

Riobamba, 2018

---

**MICHELE SOFÍA GODOY ESPÍN**

**C.I: 060481809-6**

El trabajo de titulación que presento es original y basado en los procesos de investigación y/o adaptación tecnológica establecidos en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. En tal virtud los fundamentos teóricos – científicos son de exclusiva responsabilidad del autor. El patrimonio intelectual le pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 2018

---

**MICHELE SOFÍA GODOY ESPÍN**

**C.I: 060481809-6**

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a Dios por guiarme en cada paso que doy en mi vida, por darme fuerza para seguir cumpliendo cada sueño, cada meta que me propongo.

A mis padres Susana Espín y Galo Godoy por ser el motor de mi vida, por todo el amor, confianza, y apoyo incondicional que me han dado durante todo el trayecto para cumplir esta meta.

A mis hermanos, Daniel y Sebastián, mis tíos, primos y abuelitos por brindarme su apoyo y compañía en esta etapa de mi vida.

A Edwin por su amor, su comprensión, su ayuda, por ser un pilar importante en mi vida, por cada palabra de aliento y estar junto a mí durante este proceso.

Michele

## **AGRADECIMIENTO**

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

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

Al BDF. Diego Vinueza por compartir conmigo sus conocimientos y ayudarme así a llevar a cabo este trabajo.

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

Agradezco de todo corazón a mi familia, al amor de mi vida Edwin, por estar siempre conmigo cuando los he necesitado y cuando no, porque para mí son una parte fundamental para poder alcanzar este logro, aminándome, ayudándome y sobre todo apoyándome en cada momento.

A todos muchas gracias.

Michele

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- BZ** Benzodiacepina
- FDA** Food and Drug Administration
- TOC** Trastorno Obsesivo – Compulsivo
- TEPT** Trastorno de Estrés Postraumático
- TAG** Trastorno de ansiedad generalizada
- TCC** Terapia Cognitivo Conductual
- GABA** Ácido- $\gamma$ -aminobutírico
- g** Gramos
- LC50** Concentración letal media
- OMS** Organización Mundial de la Salud
- SNC** Sistema Nervioso Central
- TA** Trastorno de Ansiedad
- LCE** Laberinto en Cruz Elevado
- CCA** Cuarto Claro – Oscuro
- CA** Campo Abierto



## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>XXI</b>
<b>ABSTRA.....</b>	<b>XX</b>
<b>II</b>	
<b>INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO I.....</b>	<b>5</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO REFERENCIA.....</b>	<b>5</b>
1.1. Género <i>Hypericum</i> .....	5
1.2. <i>Hypericum laricifolium</i> .....	5
1.2.1. División Taxonómica .....	6
1.2.2. Descripción Botánica .....	6
1.2.3. Distribución Geográfica .....	7
1.2.4. Composición Química.....	7
1.2.5. Aplicaciones .....	9
1.2.5.1. <i>Hypericum</i> para acelerar la cicatrización .....	9
1.2.5.2. <i>Hypericum</i> como antidepresivo.....	9
1.2.5.3. <i>Hypericum</i> en la industria farmacéutica.....	10
1.3. Ansiedad.....	11
1.3.1. Manifestaciones clínicas de la ansiedad.....	12
1.3.2. Causas de la ansiedad.....	12
1.3.3. Tipo de ansiedad.....	13
1.3.3.1. Trastornos de ansiedad generalizada .....	14
1.3.3.2. Trastorno de angustia y crisis de pánico.....	15
1.3.3.3. Trastorno Obsesivo – Compulsivo (TOC).....	16
1.3.3.4. Trastorno de Estrés Postraumático (TEPT).....	16
1.3.4. Tratamiento para la ansiedad.....	17

1.3.4.1.	Tratamiento farmacológico .....	18
1.3.4.2.	Fármacos antidepresivos .....	18
1.3.4.3.	Psicoterapia .....	18
1.3.5.	Neurotransmisores asociados a la ansiedad.....	19
1.3.5.1.	Ácido gamma aminobutírico .....	19
1.3.5.2.	Noradrenalina .....	20
1.3.5.3.	Serotonina.....	21
1.3.5.4.	Últimas investigaciones sobre la ansiedad .....	22
1.3.6.	Clonazepam .....	24
1.3.6.1.	Indicaciones.....	24
1.3.6.2.	Dosificación.....	25
1.3.6.3.	Mecanismo de acción .....	25
1.3.6.4.	Farmacocinética.....	26
1.3.6.5.	Contraindicaciones .....	27
1.3.6.6.	Reacciones adversas .....	27
1.3.7.	Modelos animales para el estudio de ansiedad.....	28
1.3.7.1.	Modelos de respuesta no condicionada .....	29
1.3.7.2.	Modelos de respuesta condicionada .....	30
1.3.8.	Modelo animal Mus musculus.....	31
1.3.8.1.	Clasificación taxonómica .....	31
1.3.8.2.	Características .....	31
1.3.8.3.	Comportamiento.....	32
<b>CAPITULO II.....</b>		<b>33</b>
<b>2.</b>	<b>MARCO METODOLOGICO.....</b>	<b>33</b>
2.1.	Lugar de investigación .....	33
2.2.	Recolección del material vegetal.....	33
2.3.	Identificación Botánica.....	33
2.4.	Equipos, Materiales y Reactivos .....	33

2.4.1.	Equipos.....	33
2.4.2.	Materiales.....	34
2.4.3.	Reactivos.....	36
2.5.	Acondicionamiento del material vegetal.....	37
2.6.	Análisis físico-químico de la planta seca. Parámetros de control de calidad.....	37
2.6.1.	Determinación de cenizas totales.....	37
2.6.2.	Determinación de cenizas solubles en agua.....	38
2.6.3.	Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.....	39
2.6.4.	Determinación de humedad.....	39
2.7.	Elaboración Extractos Etéreo, Alcohólico y Acuoso.....	40
2.8.	Elaboración extracto hidroalcohólico.....	41
2.9.	Tamizaje Fitoquímico.....	41
2.10.	Control de calidad del extracto Hidroalcohólico.....	43
2.10.1.	Características Organolépticas.....	43
2.10.2.	Determinación de densidad relativa.....	43
2.10.3.	Determinación del índice de refracción.....	44
2.10.4.	Determinación de pH.....	44
2.10.5.	Determinación de solidos totales.....	44
2.11.	Cuantificación de Flavonoides totales (Método de $AlCl_3$ ).....	45
2.11.1.	Fundamento.....	45
2.11.2.	Procedimiento.....	45
2.12.	Cuantificación de compuestos fenólicos (Micro método de Folin- Ciocalteau).....	46
2.12.1.	Fundamento.....	46
2.12.2.	Procedimiento.....	46
2.13.	Evaluación de la actividad ansiolítica.....	46
2.13.1.	Equipo Electrónico de medición Laberinto en Cruz Elevado.....	47
2.13.1.1.	Procedimiento.....	48
2.13.1.2.	Parámetros por medir.....	48

2.13.2.	Equipo Electrónico de medición cuatro claro-oscuro.....	49
2.13.2.1.	Procedimiento.....	49
2.13.2.2.	Parámetros por medir .....	49
2.13.3.	Equipo Electrónico de medición campo abierto.....	50
2.13.3.1.	Procedimiento.....	50
2.13.3.2.	Parámetros por medir .....	50
2.14.	Análisis estadístico .....	51
<b>CAPITULO III.....</b>		<b>52</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y</b>	
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>	
3.1.	Control de calidad de las partes áreas de la planta <i>Hypericum laricifolium</i> (Romerillo)	52
3.1.1.	Determinación de humedad.....	52
3.1.2.	Determinación de cenizas.....	52
3.1.3.	Discusión de resultados .....	52
3.2.	Tamizaje fitoquímico .....	53
3.2.1.	Discusión de resultados .....	55
3.3.	Control de calidad del extracto hidroalcohólico de <i>Hypericum laricifolium</i> .....	56
3.3.1.	Pruebas organolépticas .....	56
3.3.2.	Parámetros físicos.....	56
3.3.3.	Discusión de resultados .....	57
3.4.	Cuantificación de Flavonoides totales (Método de $AlCl_3$ ).....	58
3.4.1.	Discusión de resultados .....	58
3.5.	Cuantificación de compuestos fenólicos (Micro método de Folin- Ciocalteau) .....	59
3.5.1.	Discusión de resultados .....	59
3.6.	Análisis de la actividad ansiolítica .....	60
3.6.1.	Equipo electrónico Laberinto en cruz elevado .....	60
3.6.1.1.	Tiempo en brazos abiertos y cerrados .....	60
3.6.1.2.	Discusión de resultados .....	61

3.6.1.3.	Discusión de resultados .....	62
3.6.1.4.	Discusión de resultados .....	63
3.6.1.5.	Entradas brazos abiertos y cerrados .....	63
3.6.1.6.	Discusión de resultados .....	64
3.6.1.7.	Discusión de resultados .....	65
3.6.1.8.	Discusión de resultados .....	66
3.6.1.9.	Distancia recorrida y Velocidad media en la prueba de laberinto en cruz elevado..	66
3.6.1.10.	Discusión de resultados .....	68
3.6.1.11.	Discusión de resultados .....	69
3.6.1.12.	Discusión de resultados .....	70
3.6.2.	Equipo electrónico cuarto Claro-Oscuro .....	70
3.6.2.1.	Tiempo en el cuarto claro y cuarto oscuro .....	70
3.6.2.2.	Discusión de resultados .....	71
3.6.2.3.	Discusión de resultados .....	72
3.6.2.4.	Discusión de resultados .....	73
3.6.2.5.	Número de cruces Claro - Oscuro/ Oscuro – Claro.....	74
3.6.2.6.	Discusión de resultados .....	75
3.6.2.7.	Discusión de resultados .....	76
3.6.2.8.	Discusión de resultados .....	77
3.6.2.9.	Distancia recorrida y Velocidad media en la prueba de cuarto claro – oscuro.....	77
3.6.2.10.	Discusión de resultados .....	78
3.6.2.11.	Discusión de resultados .....	79
3.6.2.12.	Discusión de resultados .....	80
3.6.3.	Equipo electrónico Campo abierto .....	81
3.6.3.1.	Tiempo de permanencia en el centro, interior, laterales y esquinas .....	81
3.6.3.2.	Discusión de resultados .....	82
3.6.3.3.	Discusión de resultados .....	83
3.6.3.4.	Discusión de resultados .....	85

3.6.3.5.	Número de elevaciones y defecaciones .....	85
3.6.3.6.	Discusión de resultados .....	86
3.6.3.7.	Discusión de resultados .....	87
3.6.3.8.	Discusión de resultados .....	88
3.6.3.9.	Distancia recorrida y Velocidad media en la prueba de campo abierto .....	89
3.6.3.10.	Discusión de resultados .....	90
3.6.3.11.	Discusión de resultados .....	91
3.6.3.12.	Discusión de resultados .....	92
3.6.3.13.	Discusión general de los resultados de actividad ansiolítica .....	92
<b>CONCLUSIONES.....</b>		<b>96</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>		<b>98</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		
<b>ANEXOS</b>		

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla. 1-1:</b>	Taxonomía de la especie <i>Hypericum laricifolium</i> .....	6
<b>Tabla. 2-1:</b>	Tipo de pruebas para evaluar la ansiedad .....	28
<b>Tabla. 3-1:</b>	Clasificación taxonómica del ratón ( <i>Mus musculus</i> ).....	31
<b>Tabla. 4-2:</b>	Equipos utilizados.....	33
<b>Tabla. 5-2:</b>	Materiales utilizados en la parte práctica.....	34
<b>Tabla. 6-2:</b>	Reactivos utilizados en los diferentes procedimientos .....	36
<b>Tabla. 7-2:</b>	Reacciones a realizar en el extracto etéreo .....	41
<b>Tabla. 8-2:</b>	Reacciones a realizar en el extracto alcohólico .....	42
<b>Tabla. 9-2:</b>	Reacciones a realizar en el extracto acuoso.....	43
<b>Tabla. 10-2:</b>	Descripción de grupos formados para la administración.....	47
<b>Tabla. 11-3:</b>	Resultados de la determinación de humedad. ....	52
<b>Tabla. 12-3:</b>	Resultados de la determinación de cenizas totales, cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico. ....	52
<b>Tabla. 13-3:</b>	Resultados del ensayo fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuso. ....	53
<b>Tabla. 14-3:</b>	Resultados de las pruebas organolépticas del extracto de las flores de <i>Hypericum laricifolium</i> .....	56
<b>Tabla. 15-3:</b>	Resultados de los parámetros físicos del extracto hidroalcohólico de las flores de <i>Hypericum laricifolium</i> .....	56
<b>Tabla. 16-3:</b>	Resultados de la determinación de Flavonoides Totales del extracto hidroalcohólico de <i>Hypericum laricifolium</i> .....	58
<b>Tabla. 17-3:</b>	Resultados de la cuantificación de fenoles totales del extracto hidroalcohólico de <i>Hypericum laricifolium</i> .....	59
<b>Tabla. 18-3:</b>	Resultado de la permanencia en los brazos abiertos y cerrados.....	60
<b>Tabla. 19-3:</b>	Análisis estadístico ANOVA, tiempo brazos abiertos y cerrados .....	61
<b>Tabla. 20-3:</b>	Test estadístico de Tukey aplicado al tiempo de permanencia en brazos abiertos y cerrados .....	62
<b>Tabla. 21-3:</b>	Resultado del número de entradas a los brazos abiertos y cerrados .....	63
<b>Tabla. 22-3:</b>	Análisis estadístico ANOVA, Entradas brazos abiertos y cerrados.....	64
<b>Tabla. 23-3:</b>	Análisis Tukey para entradas brazos abiertos y cerrados .....	65
<b>Tabla. 24-3:</b>	Resultados de la distancia recorrida y velocidad media .....	66
<b>Tabla. 25-3:</b>	Test ANOVA para distancia recorrida y velocidad media en la prueba de laberinto en cruz elevado.....	68

<b>Tabla. 26-3:</b>	Resultados del test de Tukey para la distancia recorrida y velocidad media en el laberinto en cruz elevado.....	69
<b>Tabla. 27-3:</b>	Resultados tiempo cuarto claro y cuarto oscuro .....	70
<b>Tabla. 28-3:</b>	Resultados del test de ANOVA para tiempo de permanencia en el cuarto claro y oscuro .....	71
<b>Tabla. 29-3:</b>	Resultados del test de TUKEY para el tiempo de permanencia en el cuarto claro y oscuro .....	72
<b>Tabla. 30-3:</b>	Resultados del número de cruces de claro a oscuro y oscuro a claro .....	74
<b>Tabla. 31-3:</b>	Resultados del Test de ANOVA para el número de cruces claro- oscuro y oscuro-claro.....	75
<b>Tabla. 32-3:</b>	Resultados del test de TUKEY para el número de entradas claro – oscuro y oscuro – claro.....	76
<b>Tabla. 33-3:</b>	Resultados de la distancia recorrida y velocidad media en la prueba de cuarto claro – oscuro .....	77
<b>Tabla. 34-3:</b>	Resultados del test de ANOVA para la distancia recorrida y velocidad media en el cuarto claro oscuro .....	79
<b>Tabla. 35-3:</b>	Resultados del test de TUKEY para la distancia recorrida y velocidad media en el cuarto claro oscuro .....	80
<b>Tabla. 36-3:</b>	Datos del tiempo en el centro, interior, laterales y esquinas del equipo campo abierto .....	81
<b>Tabla. 37-3:</b>	Resultados del test de ANOVA para tiempo de permanencia en el centro, interior, lateral y esquinas de la prueba campo abierto.....	82
<b>Tabla. 38-3:</b>	Resultados del test de TUKEY para el tiempo de permanencia en el centro, interior, laterales y esquinas, en la prueba de campo abierto.....	83
<b>Tabla. 39-3:</b>	Resultados del número de elevaciones y defecaciones en la prueba de campo abierto .....	85
<b>Tabla. 40-3:</b>	Resultados del test de ANOVA para el número de elevaciones y defecaciones en la prueba de campo abierto.....	87
<b>Tabla. 41-3:</b>	Resultados del test de TUKEY para el número de elevaciones y defecaciones para la prueba en campo abierto.....	87
<b>Tabla. 42-3:</b>	Resultados de la distancia recorrida y velocidad media en la prueba de campo abierto .....	89
<b>Tabla. 43-3:</b>	Resultados del test de ANOVA para la distancia recorrida y velocidad media en la prueba de campo abierto.....	90



<b>Tabla. 44-3:</b>	Resultados del test de TUKEY para la distancia recorrida y velocidad media en la prueba de campo abierto.....	91
<b>Tabla. 45-3:</b>	Resumen estadístico de los grupos formados por el control y las diferentes dosis, en los parámetros relevantes para determinar la actividad ansiolítica y sedante .....	92
<b>Tabla. 46-3:</b>	Resumen estadístico de los grupos formado por el control y las diferentes dosis en los parámetros para evaluar actividad locomotora .....	93

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura. 1-1:</b>	<i>Hypericum laricifolium</i> .....	5
<b>Figura. 2-1:</b>	<i>Hypericum laricifolium</i> .....	7
<b>Figura. 3-1:</b>	Principales componentes presentes en <i>Hypericum laricifolium</i> .....	7
<b>Figura. 4-1:</b>	Desarrollo del trastorno de ansiedad generalizada .....	14
<b>Figura. 5-1:</b>	Tratamiento para la ansiedad generalizada .....	17
<b>Figura. 6-1:</b>	Sinapsis del ácido gamma aminobutírico.....	19
<b>Figura. 7-1:</b>	Sinapsis noradrenérgica.....	20
<b>Figura. 8-1:</b>	Sinapsis Serotoninérgica .....	21
<b>Figura. 9-1:</b>	Escaramujo.....	24
<b>Figura. 10-1:</b>	Formula química del clonazepam .....	24
<b>Figura. 11-2:</b>	Reacción de quelación del ión $Al^{3+}$ con flavonoides.....	45
<b>Figura. 12-2:</b>	Reacción de Folin- Ciocalteau. ....	46

## ÍNDICE DE GRAFICOS

<b>Gráfico 1-2:</b>	Esquema de la elaboración de los extractos Etéreo, Alcohólico y Acuoso .....	40
<b>Gráfico 2-2:</b>	Esquema de la elaboración del extracto hidroalcohólico.....	41
<b>Gráfico 3-3:</b>	Tiempo de permanencia en brazos abiertos y cerrados comparados en los diferentes tratamientos .....	60
<b>Gráfico 4-3:</b>	Número de entradas a los brazos abiertos y cerrados. ....	64
<b>Gráfico 5-3:</b>	Resultado de la distancia recorrida en el test laberinto en cruz elevado.....	67
<b>Gráfico 6-3:</b>	Resultado de la velocidad media en el test laberinto en cruz elevado. ....	67
<b>Gráfico 7-3:</b>	Tiempo de permanencia en el cuarto claro y cuarto oscuro.....	71
<b>Gráfico 8-3:</b>	Número de cruces del cuarto claro al oscuro.....	74
<b>Gráfico 9-3:</b>	Número de cruces del cuarto oscuro al claro.....	75
<b>Gráfico 10-3:</b>	Distancia recorrida en la prueba cuarto claro – oscuro.....	78
<b>Gráfico 11-3:</b>	Velocidad media en la prueba de cuarto claro – oscuro .....	78
<b>Gráfico 12-3:</b>	Tiempo de permanencia en el centro, interior, laterales y esquinas en la prueba de campo abierto.....	81
<b>Gráfico 13-3:</b>	Número de elevaciones y defecaciones en la prueba campo abierto .....	86
<b>Gráfico 14-3:</b>	Distancia recorrida en la prueba de campo abierto.....	89
<b>Gráfico 15-3:</b>	Velocidad media en la prueba de campo abierto .....	90

## ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo. B:** Recolección de la planta
- Anexo. C:** Control de calidad de la planta
- Anexo. D:** Ensayo fitoquímico en el extracto etéreo de *Hypericum laricifolium*
- Anexo. E:** Ensayo fitoquímico en el extracto alcohólico de *Hypericum laricifolium*
- Anexo. F:** Ensayo fitoquímico en el extracto acuoso de *Hypericum laricifolium*
- Anexo. G:** Filtración y concentración del extracto hidroalcohólico de *Hypericum laricifolium*
- Anexo. H:** Liofilización extracto hidroalcohólico de *Hypericum laricifolium*
- Anexo. I:** Cuantificación de flavonoides y fenoles totales
- Anexo. J:** Administración del extracto de *Hypericum laricifolium* a ratones *Mus musculus*
- Anexo. K:** Equipo Laberinto en Cruz Elevado   **Anexo. L:** Equipo Cuarto Claro – Oscuro
- Anexo. M:** Equipo Campo Abierto
- Anexo. N:** Software ITOPI para el equipo de laberinto en cruz elevado
- Anexo. O:** Software TIPOTI para el equipo cuarto claro – oscuro
- Anexo. P:** Software EMIS para el equipo campo abierto

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad ansiolítica in vivo del extracto hidroalcohólico de las flores de *Hypericum laricifolium*, administrado por vía oral a ratones *Mus musculus* y aplicando diferentes pruebas farmacológicas para evaluar el efecto ansiolítico. El extracto se elaboró con agua destilada y alcohol al 70%; en una proporción 1:10, 85 g de planta seca y triturada con 850 mL del solvente. El extracto se obtuvo por maceración durante 3 días; posteriormente, se concentró hasta eliminar el alcohol, y se liofilizó. Para la evaluación de la actividad ansiolítica, se preparó soluciones del extracto garantizando concentraciones de 25, 50, 100 y 200 mg/Kg. Finalmente, se obtuvieron las mediciones para cada biomodelo, en tres pruebas farmacológicas: laberinto en cruz elevado (LCE), cuarto claro/oscuero (CCO) y ensayo de campo abierto (CA). Se utilizó clonazepam como fármaco ansiolítico de referencia. Los datos obtenidos se procesaron en dos softwares, Itopi para los equipos laberinto en cruz elevado y cuarto claro/oscuero, y Emis para campo abierto. Los resultados más significativos en cuanto a la actividad ansiolítica, fueron presentados por las dosis: 100 y 200 mg/kg en los tres ensayos, presentando también actividad sedante, sin afectar la actividad locomotora de los biomodelos. Se recomienda hacer un estudio de toxicidad para determinar los posibles riesgos que puede presentar el extracto de *Hypericum laricifolium* administrando con dosis de 100 y 200 mg/kg.

**Palabras Clave:** <BIOQUÍMICA>, <FARMACIA>, <ACTIVIDAD ANSIOLITICA>, <ROMERILLO (*Hypericum laricifolium*)>, <RATONES (*Mus musculus*)>, <LABERINTO EN CRUZ ELEVADO (LCE)>, <CUARTO CLARO OSCURO (CCO)>, <CAMPO ABIERTO (CA)>, <ITOPI (SOFTWARE) >, <EMIS (SOFTWARE) >

## ABSTRAC

The aim of this research work was to determine the in vivo anxiolytic activity of the *Hypericum laricifolium* flower hydroalcoholic extract, administered orally to mice *Mus musculus*, applying different pharmacological tests to evaluate the anxiolytic effect. The extract was elaborated with distilled water and alcohol at 70%; in a 1:10 proportion, 85 gr of ground dry plant with 85 mL of solvent. The extract was obtained by maceration for three days; then, it was concentrated until alcohol was eliminated, and it was lyophilized. For the evaluation of the anxiolytic activity, extract solutions guaranteeing concentrations of 25, 50, 100 and 200 mg/Kg were prepared. Finally, measurements for each biomodel were obtained, in three pharmacological tests: elevated plus maze (EPM) light-dark box (LDB) and open field (OF) tests. Clonazepam was used as anxiolytic reference drug. The data obtained were processed using two different software applications, Itopi for the elevated plus maze and light-dark box, and Emis for the open field tests. The most representative results for anxiolytic activity were produced by the 100 and 200 mg/kg doses in the three tests, presenting sedative activity as well, without affecting the locomotor activity of the biomodels. A toxicity study to determine the possible risks presented by the administration of *Hypericum laricifolium* extract at 100 and 200 mg/kg doses is recommended.

**Key words:** <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACY>, <ANXIOLYTIC ACTIVITY>, <ROMERILLO (HYPERICUM LARICIFOLIUM)>, <MICE (MUS MUSCULUS)>, <ELEVATED PLUS MAZE (EPM)>, <LIGHT-DARK BOX (LDB)>, <OPEN FIELD (OF)>, <ITOPI (SOFTWARE) >, <EMIS (SOFTWARE) >

## **INTRODUCCIÓN**

### **Situación problemática**

La ansiedad es un estado emocional que experimenta una persona ante acontecimientos futuros o situaciones de incertidumbre, en la que siente intranquilidad, desesperación, congoja y/o desasosiego. Es una respuesta del ser humano en donde se presenta un sentimiento intenso y desagradable, acompañado de síntomas físicos ubicados en cualquier región corporal (Reyes, Ticas, 2005, pp. 10-12).

La ansiedad suele ser normal siempre que su intensidad, duración y frecuencia no sean frecuentes, sin embargo, este tipo de trastorno es considerado uno de los problemas psiquiátricos con mayor frecuencia en personas, puede presentarse en varias etapas de la vida y puede ser patológica cuando no existe un motivo específico de su aparición (Reyes, Ticas, 2005, pp. 10-12).

Se sabe que a nivel mundial los trastornos por ansiedad se evidencian en un 7% de la población, del cual un 6% abarca a pacientes hospitalizados. Este tipo de trastornos manifiestan consecuencias graves como impedimento de realizar cierto tipo de actividades, pérdida de empleo y gran dependencia económica por lo tanto se afecta el estilo de vida de las personas (Chan, M, 2009, p. 29).

A través de datos estadísticos obtenidos mediante estudios recientes se ha logrado comprender con mayor exactitud, el impacto con que los trastornos de ansiedad se presentan en la población. La Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que al menos 450 millones de personas padecen algún tipo de trastorno mental en el año (Puchol, Esparza, 2003, p. 21).

Actualmente, una de las enfermedades relevantes en el Ecuador es el estrés debido al estilo de vida de la población, el cuál generalmente está acompañado por problemas de ansiedad. El origen de este problema suele ser cognitivo, aunque refleja efectos a nivel fisiológico tales como: taquicardia, tensión física o sudoración (El Comercio, 2014, p. 15).

Las pacientes con trastorno de ansiedad recurrentemente tienen ataques de preocupación excesiva sin ninguna razón aparente, la cual viene acompañada de bloqueo en la toma de decisiones cotidianas, así

como dificultad para concentrarse, relajarse o dormir, con síntomas como: fatiga, contracturas, tensión muscular y dolor de cabeza, durante un periodo superior a seis meses (Pastrana, 2007, pp. 1-10).

La ansiedad es un problema de salud que va en aumento en países desarrollados y en países en vías de desarrollo, por lo tanto se busca controlar esta patología mediante diferentes tratamientos, generalmente farmacológicos, que consisten en el empleo de medicamentos ansiolíticos, antidepresivos, estabilizadores de humor y neurolépticos (Reyes, Ticas, 2005, pp. 10-11).

Actualmente los trastornos de ansiedad son los desórdenes psiquiátricos de mayor prevalencia a nivel mundial y de acuerdo con la *Food and Drug Administration* (FDA), las benzodiazepinas (agonistas indirectos del receptor (GABA-A)) son los fármacos de elección para el tratamiento de este trastorno. Sin embargo, su consumo frecuente produce tolerancia e incluso dependencia, en tanto que la interrupción brusca del tratamiento induce un síndrome de abstinencia (Sollozo, Camarena, et al, 2011, p. 79).

Las benzodiazepinas (BZ) son los fármacos con mayor uso en el tratamiento de trastornos del ritmo sueño-vigilia y en los trastornos de ansiedad, sin embargo, estos medicamentos poseen efectos secundarios indeseables por ejemplo, alteran el ciclo del sueño, producen tolerancia, dependencia, incoordinación motora y debilidad muscular, igualmente a mediano y largo plazo afectan las funciones cognitivas como la memoria y atención (Pastrana, 2007, pp. 1-10).

En una encuesta realizada a personas que padecen este tipo de trastorno, se determinó el incremento en el uso de medicina alternativa. Observando que, ante un malestar emocional, el 52.5% del total de los encuestados realizó alguna práctica de autocuidado y el 28.2% recurrió a sistemas alternativos (Sollozo, Camarena, et al, 2011, p. 80).

Nuevos estudios revelan el descubrimiento de neuronas relacionadas con la ansiedad, descubiertas en ratones (neuronas de ansiedad) y neuronas propias de humanos (escaramujos), que nos ayudan a entender mejor los mecanismos de la ansiedad, y así poder desarrollar fármacos específicos para esta patología, sin efectos secundarios que afecten el estilo de vida del paciente (BBC News Mundo, 2018, p. 1)



Las posibles alternativas al uso de fármacos químicos es la medicina tradicional, natural o fitoterapia, que de acuerdo a la OMS, es el uso de preparados hechos a base de hierbas que tienen ingredientes activos de plantas u otros materiales vegetales o combinaciones de las mismas, que pueden proporcionar una respuesta similar al fármaco y sin efectos adversos (Borrás, Navaro, et al, 2001) (Saenz, Campos, 2004, pp. 14-15).

Diversos materiales vegetales son sometidos a procesos de extracción, purificación, estandarización y verificación de su actividad farmacológica, mediante ensayos preclínicos con el objetivo de establecer su seguridad y eficacia, obteniendo así fitofármacos con autorización para ser usados clínicamente como medicamentos (Saenz, Campos, 2004, pp. 14-15).

*Hypericum laricifolium* es una especie vegetal que ha sido utilizada en medicina tradicional durante décadas, por vía tópica y oral, como astringente, antiséptico, cicatrizante, además en el tratamiento de las alteraciones del sueño, ansiedad y depresión (Borrás, Navaro, et al, 2001, pp. 48-49).

Dentro de las investigaciones sobre la familia de esta planta se destaca el estudio clínico comparativo sobre la actividad antidepresiva de *Hypericum perforatum*, en el cual se evalúa la actividad del extracto frente a la actividad de antidepresivos comerciales y placebos, obteniendo como resultado que el *Hypericum perforatum* presenta mayor eficacia respecto al placebo, sin embargo hasta el momento no se tiene mayor evidencia de la eficacia de *Hypericum laricifolium* como ansiolítico (Borrás, Navaro, et al, 2001, pp. 48-49)

En los últimos 50 años se ha desarrollado diversas pruebas en animales para identificar compuestos que podrían presentar mayor actividad ansiolítica. El empleo de ratones en modelos de ansiedad, ofrece la ventaja de ensayar en ellos diversas técnicas experimentales que en los seres humanos no serían posible, administrando extractos y/o fracciones de metabolitos secundarios que se obtienen de los diferentes órganos de las plantas en cantidades pequeñas y, al utilizar ratones, esto permite el uso óptimo de este recurso (Rejón, Perdomo, 2010, pp. 1-15).

Esta investigación se enfoca en determinar si la planta *Hypericum laricifolium* presenta un efecto ansiolítico, en base a que *Hypericum perforatum* especie del mismo género y familia presenta dicha actividad, lo que hace suponer que presentan metabolitos secundarios similares y por lo tanto la misma actividad ansiolítica, contribuyendo a encontrar una alternativa fitoterapéutica que mejore los síntomas de trastornos del sistema nervioso central sin efectos secundarios.

## OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

### Objetivo General

Determinar de la actividad ansiolítica de *Hypericum laricifolium* (Romerillo) en ratones (*Mus musculus*).

### Objetivos Específicos

- Identificar los grupos fitoquímicos presentes en el extracto de *Hypericum laricifolium* (Romerillo) mediante tamizaje fitoquímico.
- Cuantificar los fenoles totales y flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico de la especie vegetal, mediante el método de Folin Ciocalteou y el método colorimétrico – complejométrico con  $AlCl_3$  respectivamente.
- Evaluar los indicadores de ansiedad en el modelo animal de laberinto en cruz elevado, cuarto claro oscuro y campo abierto.
- Determinar la dosis del extracto hidroalcohólico en la cual se obtiene mayor efecto ansiolítico.
- Comparar estadísticamente los resultados obtenidos con los diferentes modelos.

## CAPITULO I

### 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

#### 1.1. Género *Hypericum*

*Hypericum* es el género más representativo de la familia de las Hypericeae, algunas de las 500 especies del género se conocen como hierba de San Juan, dentro de estas especies hay plantas herbáceas hasta arbustos y árboles. Sus hojas y flores varían generalmente en el color desde; un amarillo pálido a un amarillo intenso. La mayoría de especies del género *Hypericum* se encuentran en regiones templadas del hemisferio norte en donde la especie característica es *Hypericum perforatum*, y en zonas del hemisferio sur la especie típica es *Hypericum laricifolium* (Peiro, Gálves, Lucas, 2010, pp. 57-61).

#### 1.2. *Hypericum laricifolium*



**Figura. 1-1:** *Hypericum laricifolium*

**Fuente:** Michele Godoy, 2018

### 1.2.1. División Taxonómica

**Tabla. 1-1:** Taxonomía de la especie *Hypericum laricifolium*

Taxonomía	
Reino	Plantae
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Malpighiales</i>
Familia	<i>(clusiáceas) Hypericeae</i>
Género	<i>Hypericum</i>
Especie	<i>Hypericum laricifolium</i>

**Fuente:** (Constituents of *Hypericum laricifolium*. 2013).

**Realizado por:** Michele Godoy, 2018.

### 1.2.2. Descripción Botánica

Son arbustos o árboles pequeños, sufrútices o hierbas, glabros o con pelos simples; tienen un tallo con corteza exfoliante; leño fisurado. Sus hojas son opuestas, decusadas, sésiles o cortamente pecioladas, más o menos unidas en la base; lámina entera, glándulas presentes. Inflorescencia de una sola flor o numerosas flores (Rushdey, Therese, et al, 2003, pp. 1439-1440).

El fruto es una cápsula ovoide con tres cámaras en su interior o valvas que contienen numerosas semillas de color negro, pequeñas y redondeadas. Cuando las flores se machacan tornan a un color rojizo debido al desprendimiento de un pigmento denominado *hipericina* (Peiro, Gálves, Lucas, 2010, pp. 57-62).

### 1.2.3. Distribución Geográfica

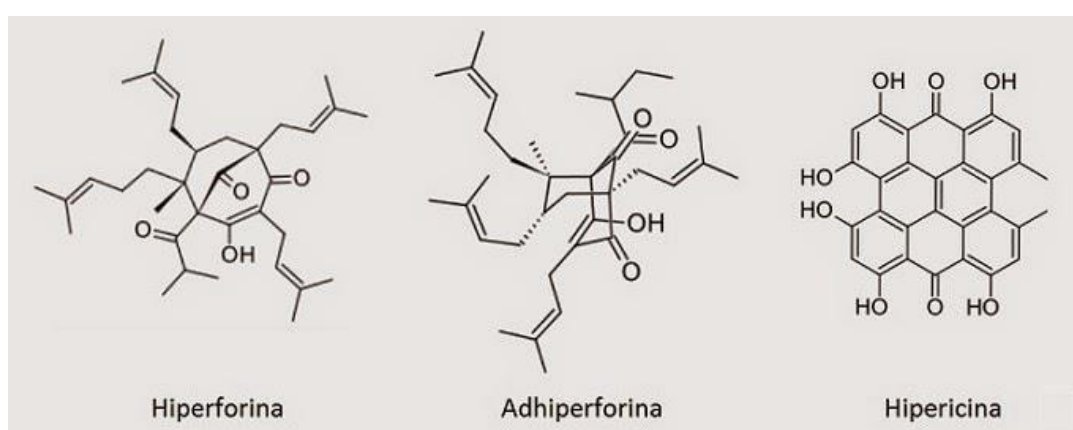


**Figura. 2-1:** *Hypericum laricifolium*

Fuente: Michele Godoy, 2018

Se encuentra bien distribuida en América del Sur, desde Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, hasta Bolivia. En Ecuador atraviesa todos los Andes, a una altitud de 2000 a 4500 msnm, En la provincia de Chimborazo se encuentra en la reserva ecológica de Polylepis, crece en su mayoría en las formaciones rocosas, tal como se muestra en la figura 2-1 (Rushdey, Therese, et al, 2003, pp. 1439-1440).

### 1.2.4. Composición Química



**Figura. 3-1:** Principales componentes presentes en *Hypericum laricifolium*

Fuente: Sánchez, 2015

**1. Aceite esencial (0,31-0,35%):** Se localiza en las partes aéreas y su concentración varía según la época de cosecha. Es rico en monoterpenos (el más importante es el  $\alpha$ -pineno), sesquiterpenos (b-cariofileno), hidrocarburos saturados (metil-2-octano, también importante), alcoholes (dodecanol), óxidos terpénicos (1,8 cineol), cetonas (6-metil-5-hepteno-2-ona), trazas de mirceno y de limoneno, cadineno y ésteres del ácido isovaleriánico (Peiro, Gálves, Lucas, 2010, pp. 57-62).

**2. Aceite fijo:** Contiene alcohol cerílico, fitosterina, hidrocarburos y glicéridos de los ácidos esteárico, mirístico y palmítico (Peiro, Gálves, Lucas, 2010, pp. 57-62).

**3. Cumarinas:** umbeliferona y escopoletina (Peiro, Gálves, Lucas, 2010, pp. 57-62).

**4. Antraquinonas:** derivados diantrónicos (naftodiantronas). Son pigmentos, los componentes de mayor interés son la hypericina (0,5-0,7%), biogénicamente derivada de la hemodolantrona, la pseudohypericina y el hyperico-dehidro- diantrona. Otros interesantes son la isohypericina y la protohypericina que por la acción de la luz del sol se transforman en hypericina. También es importante la Hyperforina (2 a 4,5%), produce efectos antimicrobianos sobre estafilococos y estreptococos, y la adhiperforina (0,2 a 1,8%) (Peiro, Gálves, Lucas, 2010, pp. 57-62).

La hipericina es responsable del color rojo del aceite de hipérico y de la coloración negruzca de los puntillados de las hojas y pétalos. Pierde potencia cuando los extractos, tabletas o zumos que la contienen se encuentran almacenados durante más de seis semanas a altas temperaturas. A 20° C se considera estable. Presenta intensa fluorescencia roja en el UV, un espectro de absorción próximo al de la oxihemoglobina, siendo soluble en alcohol y aceite. Se halla en las flores, tallos, hojas y yemas. Las naftodiantronas, en general, deben ser protegidas de la luz directa (Peiro, Gálves, Lucas, 2010, pp. 57-62).

**5. Flavonoides (0,5-0,7%):** Su concentración es mayor en las flores que en las hojas, siendo máxima en el momento previo a la floración (estadio de capullos) y en los ejemplares que crecen en zonas altas. Destacan el hiperósido (0,9%), el rutósido o rutina (1,6%) y la isoquercitrina (0,3%). El resto son flavonoles, flavonas y amentoflavonas, catequinas y proantocianidinas (Peiro, Gálves, Lucas, 2010, pp. 57-62).

**6. Ácidos fenil-carboxílicos:** caféico, clorogénico, gentísico y ferúlico (Peiro, Gálves, Lucas, 2010, pp. 57-62).

**7. Otros componentes:** taninos catéquicos (3-16%), pectina, colina, hiperforina (2,4-5%), adhiperforina (0,2-1,9%), carotenoides (luteolina, luteoxantina, epoxixantofilas), fitosteroles ( $\beta$ -sitosterol), ácido nicotínico, manitol, aminoácidos, GABA, vitamina C, flobafeno, rhodano y compuestos con actividad antibacteriana (novoimanina e imanina) (Peiro, Gálves, Lucas, 2010, pp. 57-62).

### **1.2.5. Aplicaciones**

*Hypericum laricifolium* es utilizado en la medicina tradicional como astringente, antiséptico y cicatrizante, por vía externa y por vía oral como tratamiento de las alteraciones del sueño, la depresión y la ansiedad. En algunos países como Alemania, el empleo de esta planta medicinal como antidepresivo se halla muy extendido, con más de dos millones y medio de prescripciones por año. Popularmente la terapia con la Hierba de San Juan se ha considerado segura (Borrás, Navaro, et al, 2001, pp. 48-51).

#### **1.2.5.1. *Hypericum para acelerar la cicatrización***

El uso ancestral más conocido del romerillo es como cicatrizante de las heridas, mediante una aplicación tópica. Su efecto posiblemente se deba a los aceites esenciales que posee, y que potencian los procesos de cicatrización (Borrás, Navaro, et al, 2001, pp. 48-51).

#### **1.2.5.2. *Hypericum como antidepresivo***

El uso de *Hypericum* como antidepresivo se halla muy extendido, sobre todo en países de Europa en donde se utiliza *Hypericum perforatum* como terapia alternativa para la depresión, gracias a la composición química de los extractos de *Hypericum perforatum* que contienen al menos diez constituyentes o grupos de componentes farmacológicamente activos que pueden contribuir a sus efectos antidepresivos y ansiolíticos (Borrás, Navaro, et al, 2001, pp. 48-51).

Al parecer la actividad farmacológica de la Hierba de San Juan o Romerillo se debe a las naftodiantronas, que otorgan un efecto ansiolítico (Borrás, Navaro, et al, 2001, pp. 48-51).

El mecanismo de acción de *Hypericum laricifolium* es muy poco conocido, sin embargo, se sabe que la hipericina, los flavonoides y las xantonas presentes en el extracto son capaces de inhibir de forma débil la monoaminooxidasa tipos A y B *in vitro*, incluso a concentraciones muy altas, por lo que no parece que este mecanismo sea el único implicado en su efecto terapéutico (Borrás, Navaro, et al, 2001, pp. 48-51).

En diversos estudios se ha demostrado que el extracto de esta planta puede inhibir selectivamente la recaptación de serotonina, y reducir la expresión de las citoquinas, en especial la interleukina 6. Por lo tanto, la eficacia clínica de la preparación de la Hierba de San Juan pudiera atribuirse a una combinación de varios mecanismos de acción, que en solitario, contribuirían muy poco al efecto biológico (Borrás, Navaro, et al, 2001, pp. 48-51).

La dosis recomendada del extracto de *Hypericum perforatum* que se utiliza en Europa para adultos con depresión leve a moderada es de 0,9 a 2,7 mg de hipericina al día, equivalente a un rango de 300-900 mg del extracto. Habitualmente se administra una dosis de entre 600-900 mg/día dividida en tres tomas diarias, dosis mayores (1,800 mg/día) se han empleado en pacientes con depresión severa y en niños de 6 o más años la dosis recomendada es de 0,5 mg de hipericina diarios (150-200 mg del extracto). En infusión se agrega entre 1 o 2 cucharadas (2-4 g) de la planta en 240 ml de agua durante diez minutos y se consume en una sola dosis diaria (Borrás, Navaro, et al, 2001, pp. 48-51).

#### 1.2.5.3. *Hypericum en la industria farmacéutica*

La industria farmacéutica ha investigado los principios activos tanto que, en Alemania se distribuye como tratamiento contra la depresión leve o la ansiedad. En este caso la aplicación se realiza de forma estándar, con cantidades de principios activos normalizados extraídos de esta planta. Aunque se trata de una especie que puede emplearse para tratar algunas afecciones, una ingesta inadecuada de la misma puede acarrear efectos negativos la salud, como problemas de tipo gastrointestinal, fatiga, confusión, cefalea, agitación y hasta fotosensibilidad, sobre todo, si se ingieren con otras sustancias, como tetraciclina o piroxicam (Borrás, Navaro, et al, 2001, pp. 48-51)

El *Hypericum Laricifolium* es un potente inductor enzimático de la familia del citocromo P450, de forma que puede tener interacciones con otras sustancias como la digoxina. Además, se han descrito casos en los que un trasplante de corazón ha sido rechazado por culpa de combinar esta planta con la ciclosporina (tratamiento inmunosupresor) (Borrás, Navaro, et al, 2001, pp. 48-51)



### 1.3. Ansiedad

El término ansiedad proviene del latín “*anxietas*”, angustia o aflicción; refiriendo un estado de agitación, inquietud o zozobra del ánimo; la ansiedad es una emoción humana y universal, que se encuentra estrechamente relacionada al miedo y que en muchas situaciones desde el punto de vista psicobiológico tiene como finalidad la adaptación al entorno. Generalmente, se dice que la ansiedad apunta a la combinación de diferentes manifestaciones físicas y mentales que no son atribuibles a peligros reales, sino que se expresan ya sea en forma de crisis o como un estado constante y difuso (Sierra, Ortega, et al., 2003, pp. 10-59).

Es importante comprender que la ansiedad es una sensación o un estado emocional presente en determinadas situaciones y que constituye una respuesta habitual a diferentes circunstancias cotidianas estresantes. Tan sólo cuando sobrepasa cierta intensidad o supera la capacidad adaptativa de la persona, es cuando la ansiedad se convierte en una condición patológica, provocando malestar significativo (Guía de Práctica Clínica, 2008, p. 15).

En la actualidad la ansiedad es uno de los problemas y afecciones más comunes entre humanos, y la mayoría de personas la padecen o se ven 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. 10-35).

La ansiedad como una manera de respuesta normal ante el temor y otros estímulos que suponen una condición de amenaza, tiene diversos componentes; entre los más importantes se pueden mencionar los reflejos autónomos, comportamientos defensivos y pesimistas, estado de alerta, emociones negativas y secreción de glucocorticoides (Ferre, Camarillo, 2013, pp. 1-25).

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 psicósomático ante acciones que no representan un peligro real o, por lo menos, desproporcionada en relación con el estímulo desencadenante (Flores , 2014, pp. 543-565).

El límite entre el estado de ansiedad normal o patológico, es difícil de establecer y aún no está claro, pero podría evaluarse en el nivel en el que este trastorno interfiere con las actividades cotidianas,

alcanzando un cierto protagonismo en el cual el individuo plantea toda su atención sobre dicho estado (Ferre, Camarillo, 2013, pp. 1-25).

Actualmente, existe una preocupación en la sociedad debido a las enfermedades secundarias a la ansiedad, ya que los criterios clínicos más relevantes 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. La epidemiología estima que aproximadamente un 18 %, que visita al médico a lo largo de un año lo hace debido a algún trastorno de ansiedad (Ferre, Camarillo, 2013, pp. 1-25).

### ***1.3.1. Manifestaciones clínicas de la ansiedad***

Los síntomas de la ansiedad se pueden clasificar en tres tipos; físicos, cognitivos y psicológicos. 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. Las manifestaciones físicas pueden ser agudas, en donde pueden presentarse condiciones patológicas crónicas como hipertensión y enfermedades cardiovasculares (Escamilla, 2011, pp. 57525-5733).

Tanto los síntomas psicológicos de la ansiedad con sus manifestaciones fisiológicas (taquicardia, palpitaciones, etc.) pueden aumentar en condiciones de miedo o el estado de activación o alerta. (Escamilla, 2011, pp. 5275-5733).

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. Por lo que dentro del tratamiento, un posible estado de “bloqueo” cognitivo puede dificultar la colaboración del sujeto a la terapia (Reyes, Ticas, 2005, p. 41).

### ***1.3.2. Causas de la ansiedad***

Las causas de la ansiedad no se conocen totalmente, sin embargo, se sabe que están relacionados factores biológicos, ambientales y psicosociales.

Entre los factores biológicos se han definido alteraciones en los sistemas neurobiológicos gabaérgicos y serotoninérgicos, así como anomalías en la estructura del sistema límbico (córtex paralímbico), volviéndose una de las regiones más afectadas del cerebro. Además, se han manifestado ciertas

alteraciones físicas y una mayor frecuencia de uso y/o retiro de medicinas, alcohol, drogas, sedantes y otras sustancias. Por último, existe cierta predisposición genética en la aparición de estos trastornos (Guía de Práctica Clínica, 2008, p. 15).

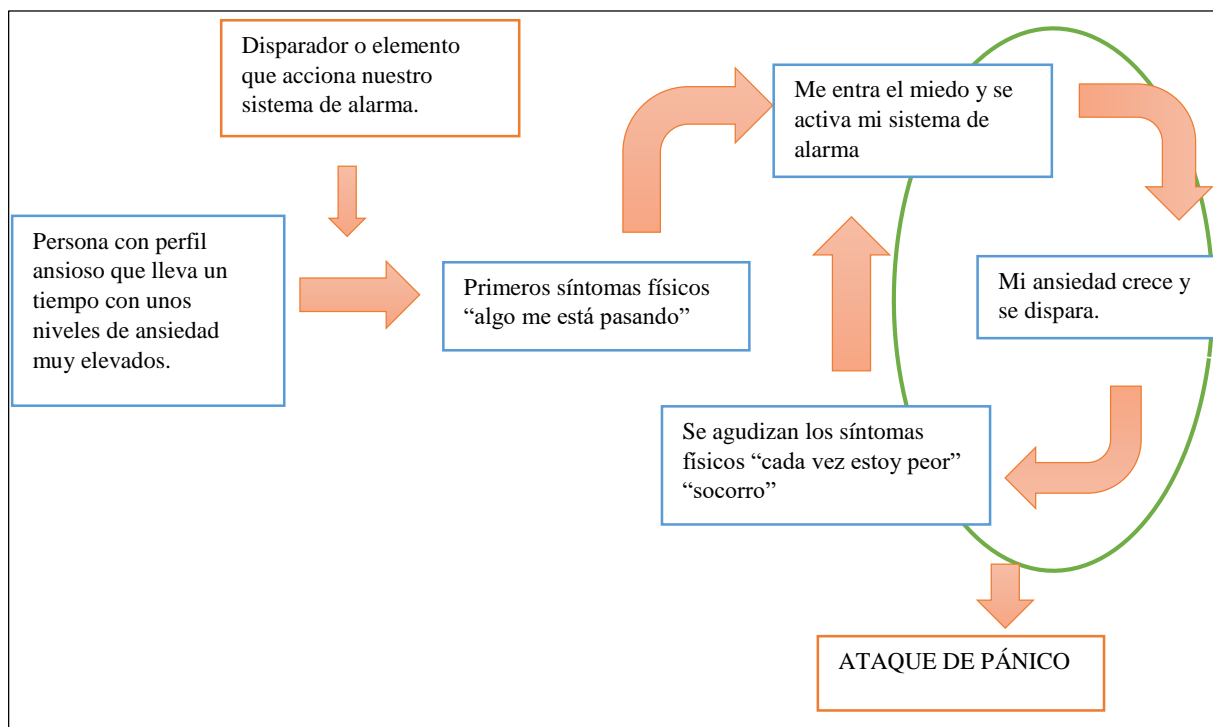
Entre los factores ambientales, el factor psicosocial y situaciones de estrés, tienen mayor influencia en la ansiedad, además, el ambiente familiar, las experiencias amenazadoras de vida y las preocupaciones excesivas por temas cotidianos. Al parecer la interacción de varios determinantes como la influencia de las características de la personalidad, favorece la aparición de estos trastornos de ansiedad; lo cual, es muy común la comorbilidad con otros trastornos mentales como los trastornos del estado de ánimo (Guía de Práctica Clínica, 2008, p. 15).

### ***1.3.3. Tipo de ansiedad***

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

- 1) Trastornos de ansiedad generalizada.
- 2) Trastorno de angustia y crisis de pánico.
- 3) Trastorno Obsesivo – Compulsivo (TOC).
- 4) Trastorno de Estrés Postraumático (TEPT) (Festorazzi, Rodríguez, et al., 2008, pp. 5-8).

### 1.3.3.1. Trastornos de ansiedad generalizada



**Figura. 4-1:** Desarrollo del trastorno de ansiedad generalizada.

**Fuente:** (Instituto Nacional Mental, 2009)

**Realizado por:** Michele Godoy, 2018

El trastorno de ansiedad generalizada (TAG) es bastante común entre las personas, generalmente 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 afeción sobre la toma de decisiones y la interferencia sobre las acciones cotidianas. Las afecciones físicas comprenden: la dificultad tanto para concentrarse, relajarse y/o adherirse al sueño nocturno (Ferre, Camarillo, 2013, pp. 22-25).

Todas estas condiciones tienden a predisponer al individuo a manifestaciones como agotamiento, cefaleas, contracturas y tensión muscular elevada, así como varios 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, pp. 22-25).

La frecuencia de este trastorno está en dependencia del criterio diagnóstico empleado, sin embargo, se estima que aproximadamente 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. 5730-5733).

### *1.3.3.2. 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. (Ferre, Camarillo, 2013, pp. 22-25).

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. 22-25).

Aunque la crisis de pánico suele durar en término medio 10 minutos, algunos síntomas pueden extenderse durante mucho más tiempo, pueden durar en promedio de 15-30 min. En algunas situaciones específicas las crisis pueden desencadenarse con mayor facilidad, por ejemplo:

- 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) (Ferre, Camarillo, 2013, pp. 22-25).

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. 22-25).

#### *1.3.3.3. Trastorno Obsesivo – Compulsivo (TOC).*

El TOC es una enfermedad que se caracteriza por pensamientos intrusivos y periódicos (obsesiones) generalmente acompañados por conductas repetitivas sin un propósito (compulsiones). Las obsesiones son pensamientos, ideas o imágenes involuntarias y repetitivas que interrumpen en la actividad mental normal del individuo y que el paciente identifica como faltos de sentido y ego-distónicas; causando un malestar significativo. La persona reconoce que estas ideas son producto de su imaginación, es decir, son percibidos como pensamientos propios pero involuntarios, lo cual hace sentir al paciente incapaz de librarse de ellos (Schalatter, Garrán, et al, 2011, p. 41).

Los TOC afectan alrededor de un 2-3% de los individuos, aparecen generalmente en la infancia, y tienden a desarrollarse durante períodos muy largos. En algunos pacientes pueden provocar una incapacidad considerable. Aún no se saben las causas de los TOC, pero se los puede tratar cada vez mejor, mediante la combinación de fármacos y de Terapia Cognitivo Conductual (TCC). Las hipótesis biológicas actuales sugieren un disfuncionamiento de los sistemas serotoninérgicos cerebrales, con una probable implicación de los núcleos grises centrales (Pelissolo A, 2012, pp. 1-10).

En relación a los factores genéticos, hay que recalcar que el TOC aparece con mayor frecuencia en familiares de personas afectadas. Los factores genéticos son posiblemente el principal factor a la aparición de esta patología, como se ha descubierto en la historia familiar de pacientes y en estudios con gemelos (Schalatter, Garrán, et al, 2011, p. 41).

#### *1.3.3.4. Trastorno de Estrés Postraumático (TEPT)*

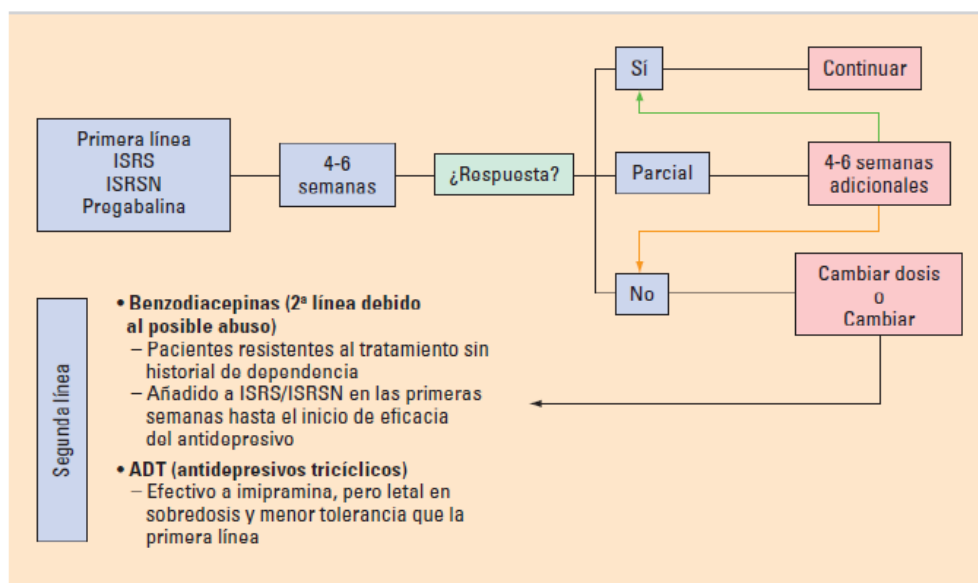
El TEPT se genera después de una experiencia aterrizante que implica daño físico o la amenaza de daño físico. La persona que desarrolla el TEPT puede haber sido afectada, el daño puede haberle sucedido a una persona querida, o puede haber sido testigo/a de un evento traumático que le ocurrió a sus seres queridos o a desconocidos (Instituto Nacional Mental, 2009, p. 32).

Los pacientes con TEPT pueden asustarse fácilmente, paralizarse a nivel emocional (especialmente con personas cercanas a ellas), perder interés en las cosas que usualmente acostumbraban disfrutar, tener problemas para mostrarse cariñosas, ponerse irritables, agresivas, o incluso violentas (Instituto Nacional Mental, 2009, p. 32).

Estos pacientes evitan escenarios que les recuerdan el incidente original y los aniversarios del incidente son generalmente un momento muy difícil. Los síntomas del TEPT empeoran cuando el evento que los provocó fue suscitado deliberadamente por otra persona, como por ejemplo e caso de un asalto o secuestro (Instituto Nacional Mental, 2009, p. 32).

No todas las personas que experimentan experiencias traumáticas presentan un TEPT completamente desarrollado o leve. Normalmente, los síntomas inician dentro de los tres meses luego del incidente, pero pueden surgir esporádicamente varios años después. Para que se considere un caso de TEPT los síntomas deben presentarse por más de un mes. La evolución de la enfermedad suele diferir. Algunas personas se pueden recuperar después de seis meses, mientras que otras tienen síntomas que permanecen por mucho más tiempo y pueden volverse crónicas (Instituto Nacional Mental, 2009, p. 32).

#### 1.3.4. Tratamiento para la ansiedad



**Figura. 5-1:** Tratamiento para la ansiedad generalizada

Fuente:(Navarro & Moreira. 2013)

Los trastornos de ansiedad poseen tratamientos que en la mayoría de los casos son efectivos. Estos tratamientos pueden normalizar la vida del paciente satisfactoriamente. Lo común es la combinación de tratamiento farmacológico, enfocado a mejorar los síntomas principales, y tratamiento psicoterapéutico, dirigido hacia las conductas y pensamientos que generan y mantienen la ansiedad (Navarro, Moreira., 2013, p. 16).

#### *1.3.4.1. Tratamiento farmacológico*

El tratamiento farmacológico está dirigido a mantener bajo control los síntomas del trastorno de ansiedad mientras el paciente recibe psicoterapia, la medicación debe ser prescrita por médicos, generalmente psiquiatras, quienes ofrecen psicoterapia o trabajo en equipo con psicólogos, trabajadores sociales, o consejeros. Los fármacos esenciales usados para los trastornos de ansiedad son antidepresivos, medicamentos ansiolíticos (pastillas para la ansiedad/nervios), y bloqueadores beta para manejar algunos de los síntomas físicos. Con un tratamiento adecuado, la mayoría de los pacientes con trastornos de ansiedad pueden mejorar su estilo de vida (Instituto Nacional Mental, 2009, p. 32).

#### *1.3.4.2. Fármacos antidepresivos*

Los antidepresivos se enfocan en el tratamiento la depresión, sin embargo, tienen efectos positivos en los trastornos de ansiedad. Sin embargo estos medicamentos producen un cambio en la química del cerebro desde la primera dosis, para tener un efecto total se requiere de una serie de cambios; usualmente toma entre 4 y 6 semanas para que los síntomas desaparezcan. Es importante tomar estos medicamentos durante el tiempo suficiente para permitir que funcionen (Instituto Nacional Mental, 2009, p. 32).

#### *1.3.4.3. Psicoterapia*

La psicoterapia es un tipo de tratamiento que implica una serie de sesiones con un profesional capacitado en la salud mental, como un psiquiatra, psicólogo, trabajador social, o consejero, para averiguar cuál es la causa del trastorno de ansiedad y le enseña al paciente métodos para manejar sus síntomas (Navarro, Moreira., 2013, p. 17).

La atención primaria es una forma más simple y natural se la conoce como psicoterapia de “apoyo” y se basa en escuchar con empatía, y con la que el terapeuta valora a las emociones e ideas del paciente, y este puede expresar sus sentimientos, inquietudes y sentirse reconfortado reforzando su autonomía para superar el problema que le causa ansiedad (Navarro, Moreira., 2013, p. 17).

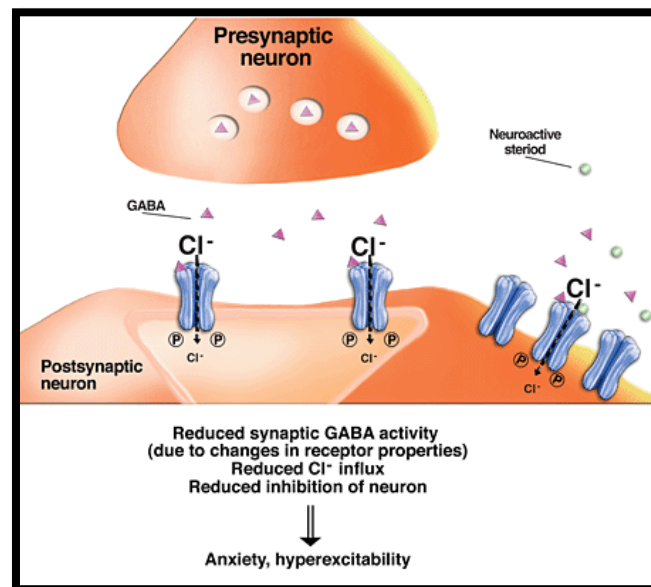


### 1.3.5. Neurotransmisores asociados a la ansiedad

Una neurona secreta productos llamados “neurotransmisores” que ejercen una acción específica sobre un receptor específico cuando son liberados. Los receptores pueden ubicarse en la membrana neuronal y pueden localizados tanto en otra neurona como en la propia neurona que los sintetiza (Gonzales, 2014, p. 240).

Los principales neurotransmisores relacionados con la ansiedad son el ácido gamma aminobutírico (GABA), la noradrenalina y la serotonina (Marsiglia, 2010, pp. 10-12).

#### 1.3.5.1. Ácido gamma aminobutírico



**Figura. 6-1:** Sinapsis del ácido gamma aminobutírico

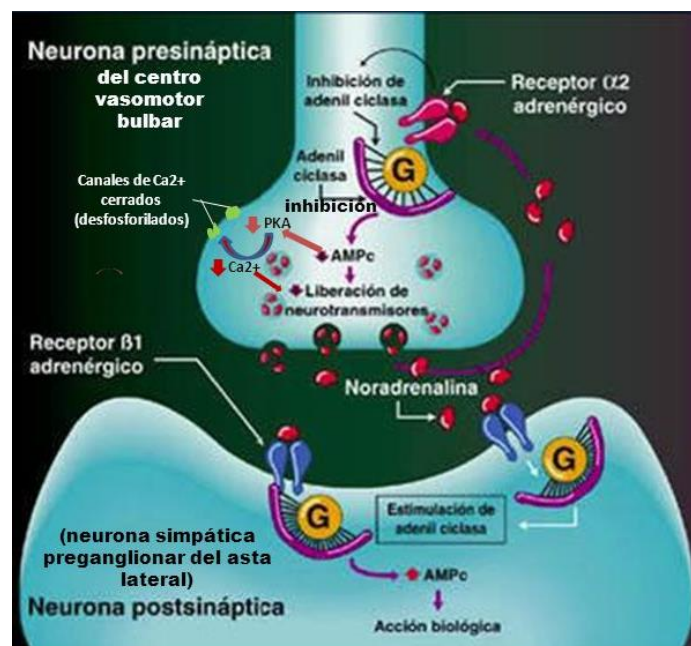
Fuente: (Gonzales, 2014)

El GABA es un neurotransmisor que se encuentra distribuido ampliamente por el sistema nervioso y que presenta una acción inhibitoria sobre las sinapsis neuronales. El receptor específico del GABA, localizado en la membrana neuronal, está asociado con un canal de cloro, de manera que cuando el GABA se une a su receptor, el canal de iones de cloro se abre, dando paso a la entrada de iones de cloro en la neurona, produciéndose una hiperpolarización de la membrana que desencadena una disminución de la “excitabilidad” celular. El papel del GABA en los problemas de ansiedad se basa en la eficacia de las benzodiazepinas en el tratamiento de este trastorno (Gonzales, 2014, p. 38).

Las benzodiacepinas ejercen su mecanismo de acción mediante el enlace con un receptor específico unido estructural y funcionalmente con el receptor del GABA, específicamente del subtipo GABA<sub>A</sub>. Cuando las benzodiacepinas se acoplan a su receptor, la entrada de iones cloro mediada por el GABA aumenta. La presencia en nuestro organismo de un receptor al que se unen de manera específica las benzodiacepinas sugiere la presencia de alguna sustancia endógena, que aún no ha sido descubierta pero que es capaz de fijarse a ese lugar y su variación podría deberse con la aparición de los trastornos de la ansiedad (Gonzales, 2014, p. 38).

Los mecanismos implicados con el sistema GABA-érgico podrían tener mayor importancia en los trastornos de ansiedad generalizada, sin embargo es importante saber que el sistema GABA está íntimamente relacionado con otros sistemas de neurotransmisión cerebral, con importantes conexiones con el *locus coeruleus* (núcleo original del sistema noradrenérgico) y con los núcleos del rafe (núcleo del sistema serotoninérgico) (Gonzales, 2014, p. 38).

### 1.3.5.2. Noradrenalina



**Figura. 7-1:** Sinapsis noradrenérgica

Fuente: (Escamilla, 2011).

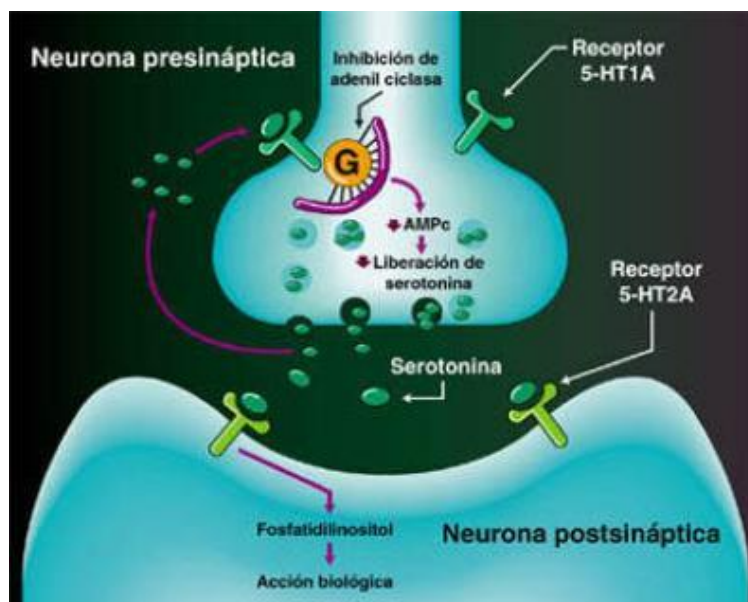
El sistema noradrenérgico es un sistema neuroquímico implicado en la neurobiología de la ansiedad. Al *locus coeruleus* (mayor núcleo noradrenérgico del sistema nervioso central) se le considera como el

centro fundamental de las reacciones de alerta del organismo, ya que la estimulación eléctrica de este núcleo en animales de experimentación, produce efectos similares a los producidos por un peligro real con manifestaciones de conducta relacionadas con el miedo y la ansiedad (Gonzales, 2014, p. 240) .

Sin embargo, la inhibición de este núcleo bloquea totalmente la capacidad de los animales para expresar una respuesta de alerta ante un peligro. Además, estudios realizados en seres humanos indican que en pacientes con trastorno de pánico, los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos y los antagonistas  $\alpha$ 2-adrenérgicos podrían provocar crisis de angustia recurrentes y graves (Gonzales, 2014, p. 240) .

Al contrario, la clonidina (antagonista  $\alpha$ 2-adrenérgico) disminuye los síntomas de ansiedad en ciertas situaciones experimentales y terapéuticas, la actividad noradrenérgica en el sistema nervioso periférico incrementa significativamente en los trastornos de ansiedad, y más en el trastorno de pánico, según datos relevantes de algunos estudios, que indican elevaciones de los niveles plasmáticos y urinarios de catecolaminas y sus metabolitos. Por lo cual aún no se conoce el hecho de que si la actividad noradrenérgica se eleva es una causa o una consecuencia de la reacción normal de organismo frente a la ansiedad (Gonzales, 2014, p. 240) .

### 1.3.5.3. Serotonina



**Figura. 8-1:** Sinapsis Serotoninérgica

Fuente: (Gonzales, 2014)

Existen datos que apoyan la teoría de una relación entre la serotonina y la ansiedad, estos estudios provienen de la investigación psicofarmacológica, que indica que, fármacos como la azaspirona, agonistas de los receptores 5HT1, presentan efecto ansiolítico, de la misma manera otros fármacos antagonistas de receptores 5HT2 y antagonistas de receptores 5HT3 poseen un efecto ansiolítico (Gonzales, 2014, p. 241).

#### *1.3.5.4. Últimas investigaciones sobre la ansiedad*

En un nuevo estudio dirigido por investigadores del centro médico de la universidad de Columbia en Estados Unidos, se ha descubierto nuevas neuronas, denominadas “neuronas de ansiedad”, estas neuronas fueron descubiertas en animales de experimentación (ratones), y se encuentran localizadas en el hipocampo, y probablemente estas neuronas estén presentes también en humanos (Lopez, M, 2018, p. 1).

Según René Hen, co-autor de dicha investigación, el objetivo fue tratar de comprender qué es lo que funciona mal en el trastorno de ansiedad. Siguiendo la evidencia de que el hipocampo está implicado en la regulación del estado de ánimo, hasta el punto de que la alteración de la actividad en el ápice ventral de esta región cerebral puede disminuir la ansiedad (Lopez, M, 2018, p. 1).

De igual manera, se conoce que el hipocampo envía señales a otras áreas del cerebro, sobre todo a la amígdala y al hipotálamo, implicadas en el control del comportamiento relacionado con la ansiedad (Lopez, M, 2018, p. 1).

En ese mismo contexto, se utilizó roedores a los cuales se les insertaron un microscopio en miniatura en el cerebro y les dejaron moverse libremente, cuando los animales se encontraban en una situación que les provocaba ansiedad, se activaban un grupo de neuronas específicas en la región ventral del hipocampo, mientras mayor sea la ansiedad del animal, la actividad neuronal será mayor (Lopez, M, 2018, p. 1).

La técnica “optogenética” basada en la emisión de haces de luz, permite controlar la actividad neuronal. Con esta se ha descubierto que cuando se ‘apagaban’ las neuronas del hipocampo, los

animales pierden el miedo y se pasean por sitios elevados y estrechos y no les importaba permanecer en espacios abiertos a la vista de todos. Por el contrario, cuando estas células eran sobre estimuladas, los ratones se muestran totalmente temerosos incluso en los lugares que en condiciones normales permanecen tranquilos (Lopez, M, 2018, p. 1).

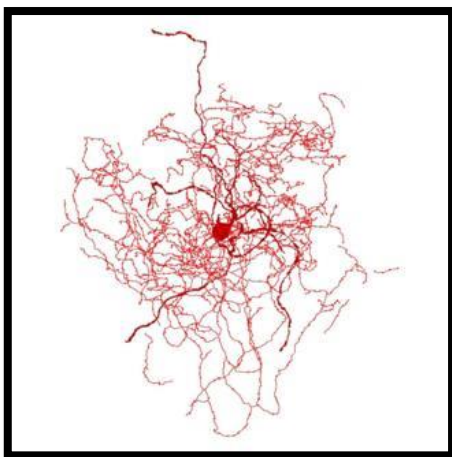
Este estudio describe el lugar exacto en donde se encuentran las “neuronas de ansiedad”, lo cual a futuro podría permitir encontrar los receptores específicos de dichas neuronas, así como tener la oportunidad de desarrollar nuevos fármacos con mayor potencial para la ansiedad, pero sin los efectos secundarios de los ansiolíticos ya existentes (Lopez, M, 2018, p. 1).

Los escaramujos o *rosehip*, son nuevas neuronas encontradas específicamente en humanos, ubicadas en la primera capa del cerebro llamada neocórtex, estas neuronas forman parte de un subtipo de neuronas llamadas inhibitoras, es decir, que bloquean impulsos nerviosos muy específicos (BBC News Mundo, 2018, p. 1).

La morfología de los escaramujos es similar a una rosa sin pétalos, pequeña, con varias ramificaciones cortas y al parecer la unión con su pareja celular se hace solo a través de una parte muy específica de su masa. Lo cual según el neurólogo Gábar Tamás, puede significar que controlan el flujo de información de forma muy específica (BBC News Mundo, 2018, p. 1), (Zahumenszky, C, 2018, p. 1).

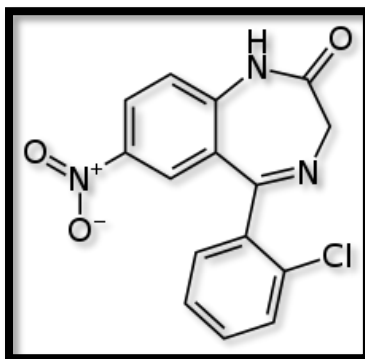
Por el momento no se conoce su función específica, pero por su localización, se cree que pueden estar relacionados con trastornos cognitivos, o neuropsiquiátricos, ya que el neocórtex, está encargado de la conciencia, característica exclusiva y extremadamente importante en humanos (BBC News Mundo, 2018, p. 1).

Al ser lo escaramujos neuronas solo de humanos, explicaría por qué algunos fármacos para trastornos neuronales, funcionan bien en animales de experimentación, específicamente ratones y no en seres humanos, por lo cual es importante realizar estudios en modelos más parecidos y ajustados al cerebro humano, o en especies estrechamente parecidos (BBC News Mundo, 2018, p. 1).



**Figura. 9-1:** Escaramujo  
Fuente: (BBC, 2018)

### 1.3.6. Clonazepam



**Figura. 10-1:** Formula química del clonazepam  
Fuente: (Vega, Zambrano, 2010)

El clonazepam es una benzodiazepina agonista del receptor GABA que incrementa la frecuencia de apertura del receptor, aumentando la recaptación de Cl por la neurona y una hiperpolarización neuronal (Vega, Zambrano, 2010, p. 5).

#### 1.3.6.1. Indicaciones

**Trastornos de pánico:** Esta indicado en los trastornos de angustia, ataque de pánico con o sin agorafobia (Vega, Zambrano, 2010, p. 5).

**Trastornos comiciales:** Esta indicado solo o como coadyuvante en el tratamiento del síndrome de Lennox Gastaut, crisis convulsivas acinéticas y mioclónicas (Vega, Zambrano, 2010, p. 5).

#### 1.3.6.2. *Dosificación*

El clonazepam se administra por vía oral con las siguientes formas de dosificación:

**Adultos y adolescentes de > 30 kg:** La dosis inicial es de 0.25 mg dos veces por día. Esta dosis se puede aumentar gradualmente con incrementos de 0.5 a 1 mg cada tres días hasta conseguir la estabilización del trastorno o hasta que los efectos adversos indiquen que los aumentos son perjudiciales. Las dosis máximas recomendadas no deben superar a 20 mg/día. Generalmente las dosis medias de mantenimiento van entre 2 y 8 mg/día (Drac, Barreto, et al, 2003, pp. 1-27).

**Ancianos o pacientes debilitados:** Estos pacientes requieren una dosis inicial menor y un ajuste con incrementos de dosis más pequeños (Drac, Barreto, et al, 2003, pp. 1-27).

**Niños >10 años (> 30 kg):** Las primeras dosis debe ser de 0,01-0,03 mg/kg (sin sobrepasar los 0,05 mg/kg/día) tomándolas tres veces en dosis iguales. En caso de necesitar dosis más altas, se debe incrementar de 0,25 a 0,5 mg/día cada 3 días, hasta llegar al máximo de 0.1-0.2 mg/kg/día, siempre dividido en tres tomas (Drac, Barreto, et al, 2003, pp. 1-27).

#### 1.3.6.3. *Mecanismo de acción*

Es un antiepiléptico, de acción prolongada. Ejerce su acción como agonista de los receptores BZ (benzodiazepínicos) cerebrales, ampliando el efecto inhibitor del GABA (gamma-aminobutírico), eliminando la difusión de la actividad convulsiva producida por un foco epiléptico, sin embargo no inhibe la descarga normal del foco (Vega, Zambrano, 2010, p. 5).

El clonazepam tiene efectos farmacológicos propios de las benzodiazepinas: anticonvulsivante, sedante, miorrelajante y ansiolítico. De la misma forma que con las demás benzodiazepinas, se presume que estos efectos podrían ser específicamente por la inhibición postsináptica mediada por el GABA; no

obstante, según estudios realizados se pone de manifiesto un efecto del clonazepam sobre la serotonina (Vega, Zambrano, 2010, p. 5).

Según con los datos derivados de estudios en animales de experimentación y ensayos electroencefalográficos (EEG) realizados en seres humano, el clonazepam reduce rápidamente varios tipos de actividad paroxística: descargas de puntas y ondas en los eventos de ausencias típicas (pequeño mal), ondas y puntas lentas, ondas y puntas generalizadas, puntas de localización temporal o de otro tipo y ondas y puntas irregulares (Vega, Zambrano, 2010, p. 5).

#### 1.3.6.4. *Farmacocinética*

**Absorción:** El clonazepam se absorbe rápida y totalmente. Las concentraciones plasmáticas máximas del fármaco se alcanzan al cabo de 1-4 horas. La biodisponibilidad absoluta por vía oral es del 90%. El tiempo medio de absorción es de 25 min aproximadamente. Las concentraciones plasmáticas en estado de equilibrio para una dosificación de una vez al día, son tres veces mayor que las alcanzadas después de una única dosis oral (Drac, Barreto, et al, 2003, pp. 1-27).

**Distribución:** Se distribuye rápidamente a los diferentes órganos y tejidos, generalmente fijándose a las estructuras cerebrales. El tiempo medio de distribución es alrededor de 0,5-1 hora. El volumen de distribución es de 3 L/Kg. Su fijación a proteínas es del 82-86%. Se cree que el clonazepam penetra la barrera placentaria, ya que se ha descubierto su presencia en la leche materna (Drac, Barreto, et al, 2003, pp. 1-27).

**Metabolismo:** La transformación metabólica del clonazepam se produce por hidroxilación oxidativa y reducción del grupo 7 nitro a 7-amino o 7 acetilamino que pueden conjugarse para formar nuevos metabolitos, principalmente 7-acetamino-clonazepam. El citocromo hepático C-450 3A4 está relacionado con la nitrorreducción del clonazepam a sus metabolitos farmacológicamente inactivos (Drac, Barreto, et al, 2003, pp. 1-27).

En orina se excreta aproximadamente el 50-70% de la dosis y entre el 10-30% se elimina como metabolitos en las heces. El clonazepam intacto que se excreta por la orina es usualmente menor al 2%



de la dosis administrada. Los metabolitos presentes en la orina se hallan como compuestos libres y conjugados (glucurónido y sulfato) (Drac, Barreto, et al, 2003, pp. 1-27).

**Eliminación:** La semivida de eliminación es de 30-40 horas. El aclaramiento es de 55 mL/min. La cinética de eliminación en niños es casi igual a la observada en adultos (Drac, Barreto, et al, 2003, pp. 1-27).

#### 1.3.6.5. *Contraindicaciones*

El clonazepam puede producir un aumento de la salivación, lo cual se debe tener en cuenta antes de administrar en pacientes con enfermedades obstructivos respiratorios (EPOC), esofágicos o apnea del sueño, Por los efectos depresores que produce sobre el sistema nervioso central se debe indicar a los pacientes que el fármaco puede producir somnolencia e incapacidad para llevar a cabo actividades específicas o que necesiten de agilidad mental (Drac, Barreto, et al, 2003, pp. 1-27).

De igual forma el clonazepam no debe utilizarse en pacientes con antecedentes de hipersensibilidad a las benzodiazepinas, con evidencia clínica o bioquímica de enfermedad hepática significativa. Puede administrarse en pacientes con glaucoma de ángulo abierto sometidos a una terapia adecuada, pero no en pacientes con glaucoma agudo de ángulo estrecho (Drac, Barreto, et al, 2003, pp. 1-27).

#### 1.3.6.6. *Reacciones adversas*

La mayor parte de las reacciones adversas asociadas a los tratamientos con clonazepam son causadas por el efecto que produce sobre el sistema nervioso central, como jaquecas, somnolencia, ataxia, mareos, confusión, depresión, disartria, síncope, cansancio, temblores y vértigo. Con el tiempo, estos síntomas se atenúan (Drac, Barreto, et al, 2003, pp. 1-27).

Por otro lado, puede producirse una estimulación del sistema nervioso central que genera hostilidad, pesadillas, excitación, manías, temblores, euforia, alteraciones del sueño, espasmo muscular, ataques de rabia e híper reflexia. Estas reacciones tienen mayor frecuencia en pacientes psiquiátricos y en niños hiperactivos. En estos casos, se recomienda suspender el tratamiento con clonazepam (Drac, Barreto, et al, 2003, pp. 1-27).

Otras reacciones adversas que se presentan con menor frecuencia, son bradicardia, hipotensión, rash, urticaria, visión borrosa, diplopía, sofocos, constipación, náuseas y vómitos, disminución del libido, disfunción hepática y dolor abdominal (Drac, Barreto, et al, 2003, pp. 1-27).

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

Los modelos animales, han evolucionado para explicar diversas patologías, específicamente la ansiedad, ya que tiene algunas ventajas como: controlar el ambiente en el que los sujetos se encuentran y de la historia conductual, puede realizarse diversas manipulaciones experimentales que permiten determinar la eficacia terapéutica de diferentes tratamientos, lo cual ayuda a validar ciertos modelos (Polanco, Vargas, et al., 2012, p. 8).

Por lo cual los modelos animales para que igualen las condiciones originales de los humanos deben contemplar diferencialmente la etiología, fisiología, sintomatología y su tratamiento, procurando el buen trato de las especies animales según las legislaciones que dictaminan el manejo y uso de animales de laboratorio de acuerdo a las restricciones ambientales y de movimiento, así como demandas excesivas de esfuerzo, privación de agua y alimento, estímulos aversivos, administración de drogas, preparaciones crónicas, aislamiento, y de más (Polanco, Vargas, et al., 2012, p. 8).

**Tabla. 2-1:** Tipo de pruebas para evaluar la ansiedad

<b>Modelos de respuesta no condicionada</b>	<b>Modelos de respuesta condicionada</b>
Campo abierto.	Respuesta emocional condicionada.
Tabla de agujeros.	Supresión condicionada.
Caja de dos compartimientos blanco-negro (campo claro-oscuro).	Evitación pasiva/ activa.
Laberinto en cruz elevado.	Prueba de cuatro platos.
Interacción social.	Test de conflicto de Geller-Seifter y test de Vogel.
Suspensión 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.	Potenciación de la respuesta de sobresalto.

**Fuente:** (Polanco, Vargas, et al., 2012).

**Realizado por:** Michele Godoy 2018.

### *1.3.7.1. Modelos de respuesta no condicionada*

Estos modelos permiten medir la respuesta conductual o fisiológica ante estímulos estresantes o nuevos. Algunos valoran el miedo ante situaciones novedosas, exponiendo al sujeto a un espacio abierto, alto o con luces brillantes. En estos modelos se evita la privación de agua o comida, así como la administración de choques eléctricos y no se requiere de periodos largos de entrenamiento (Polanco, Vargas, et al., 2012, p. 9)

Según Pellow, Chopin, File & Briley estos modelos presentan ciertas ventajas que promueven su utilización como: tiene validez ecológica al ser una prueba rápida y sencilla, es económica ya que no se necesita equipos costosos, tiene cierta sensibilidad bidireccional, para las manipulaciones de ansiedad, no se precisa de largos procedimientos de formación que impliquen la privación de alimento y agua (Polanco, Vargas, et al., 2012, p. 9).

#### *1.3.7.1.1. Laberinto en cruz elevado (LCE)*

El laberinto en cruz elevado (LCE) es conocido como uno de los modelos experimentales de ansiedad más utilizados para bioensayo de fármacos ansiolíticos. Este modelo está basado en la libre exploración que despliegan los roedores frente a un ambiente novedoso, permite a través de su arquitectura, elegir entre dos zonas distintas: un par de brazos potencialmente peligrosos (brazos abiertos) y un par de brazos seguros (brazos cerrados) (Celis.C, Marinez.D, et al, 2010, pp. 1-9).

Este modelo se encuentra dentro del grupo de pruebas basadas en el estudio de conductas incondicionadas o espontáneas, además de tener "validez ecológica" ya que emplea estímulos "naturales" que pueden inducir ansiedad en humanos. Se asume que en los brazos abiertos del laberinto se produce una combinación de miedo a un ambiente no familiar, a un espacio abierto intensamente brillante, y a una situación de equilibrio en una superficie relativamente angosta y situada a una altura considerable. Hipotéticamente estos miedos podrían ser similares a la agorafobia y el vértigo, respectivamente. Por otro lado, los brazos cerrados presentan altas paredes que ofrecen protección ante posibles peligros (Cárdenas, Navarro, 2002, pp. 20-25).

#### *1.3.7.1.2. Cuarto Claro- Oscuro (CCO)*

El test de luz-oscuridad, o cuarto claro-oscuro, originariamente ideado por Crawley y Goodwin. Se basa en el comportamiento nocturno que los roedores poseen, ya que muestran una aversión natural a la luz, con lo cual normalmente pasarán más tiempo en el cuarto oscuro que en el iluminado. Por otra parte, su instinto explorador los lleva a intentar conocer el medio no familiar al que son expuestos, lo cual hace que el animal camine de un compartimiento a otro, estos cruces permiten medir la locomoción del roedor (Vogel, H, 2008, pp. 51-60).

#### *1.3.7.1.3. Campo abierto (CA)*

La prueba de campo abierto fue descrita por Hall en 1934, evaluando el grado de “ansiedad”. Se basa en colocar al roedor en un medio ambiente desconocido, exponiéndolo a una caja sin posibilidad de escape. Según las observaciones de Hall, se consideró que la respuesta estaba basada por medio de la actividad del sistema nervioso autónomo (simpático) y se tomó como primeras medidas indicativas de ansiedad a la defecación y la micción, además permite medir la actividad motora y locomotora (Rejón.O, Perdomo,R, 2011, pp. 1-7).

#### *1.3.7.2. Modelos de respuesta condicionada*

Estos modelos se fundamentan en la capacidad de responder ante un estímulo de manera específica a otro estímulo. Generalmente se presenta un estímulo de rechazo, que podría ser un choque eléctrico, aplicado al animal quien debe emitir una respuesta determinada (Polanco, Vargas, et al., 2012, p. 10).

Permiten un control exacto de los niveles de conducta basal por parte del experimentador, estas pruebas generalmente requieren que los sujetos de experimentación sean entrenados y en el diseño experimental se abarquen varios grupos de sujetos control para eliminar los efectos no específicos del tratamiento sobre aspectos como el aprendizaje, la memoria, apetito y las funciones motoras y perceptuales (Polanco, Vargas, et al., 2012, p. 10).

### 1.3.8. Modelo animal *Mus musculus*

Los animales de laboratorio son modelos experimentales que ciertas cualidades las cuales nos ayudan a investigar las enfermedades que afectan al ser humano, las ratas y ratones están entre los biomodelos que cumplen con esos requerimientos, son de fácil manejo y tienen las características apropiadas (Geréz, Gullace, 2011, p. 56).

El animal de laboratorio es un ser vivo y debe ser tratado según las normas de bioética, por lo tiene necesidades, siente dolor, es por esto que el compromiso del investigador es asegurar el bienestar y confort del animal de laboratorio mientras este con vida (Geréz, Gullace, 2011, p. 56).

#### 1.3.8.1. Clasificación taxonómica

**Tabla. 3-1:** Clasificación taxonómica del ratón (*Mus musculus*)

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

**Fuente:** (Geréz, Gullace, 2011).

**Realizado por:** Michele Godoy 2018.

#### 1.3.8.2. Características

El ratón es un mamífero de sangre caliente, tiene hábitos nocturnos y su comportamiento natural está influenciada por feromonas. Por su pequeño tamaño esta especie es apta a cambios ambientales, ya que un cambio de la temperatura en el rango de 2 a 3°C modificaría su fisiología por cambios en la temperatura corporal (Benavides, Guénet, 2003, p. 312).

En la edad adulta el tamaño del ratón varía entre 12 a 15 cm desde la punta de la cola a la nariz; la medida de la cola es similar a la longitud del cuerpo y presentan un peso aproximado de 30 gr. Después

del parto las crías tienen un peso aproximado que va entre 1 a 2 g, y que se incrementa considerablemente durante la lactancia. El ratón de laboratorio es una especie de naturaleza mundial, ya que puede adaptarse a varias condiciones ambientales, desde zonas tropicales a regiones muy frías, con preferencia por las zonas secas (Benavides, Guénet, 2003, p. 312).

El ratón posee un agudo sentido auditivo, y del olfato, no sólo para identificar rápidamente su comida y depredadores, sino también para definir el orden social de su ambiente. Al contrario su visión es muy pobre, ya que no puede percibir colores. Cerca de la órbita del ojo se encuentran unas glándulas con forma de herradura llamadas glándulas Harderianas, responsables de la excreción de porfirina (sustancia de color marrón), excretada ante situaciones de premura o estrés (Benavides, Guénet, 2003, p. 312).

El sistema social depende del número de ratones que forman parte de su población, presentan un rango social definido por lo que son modelos aptos para determinaciones *in vivo* que estudian los trastornos sociales y cognitivos. Habitualmente son muy dóciles, exceptuando algunas cepas sobre las cuales no se tenga un control exacto de sus crías, y se les denomina exocriadas que se caracterizan por mantener su agresividad, al igual que sus antecesores salvajes (Benavides, Guénet, 2003, p. 312).

#### 1.3.8.3. *Comportamiento*

El ratón generalmente es sociable, permanecen en grupos sin ningún problema. Algunas cepas de machos muestran su agresividad entre la séptima y décima semana de edad, aunque los grupos se hayan establecido justo después del destete. En el grupo de machos existe uno dominante que podría ser demasiado agresivo. En los grupos de hembras no se observan peleas frecuentes, incluso cuando se han agrupado en una misma jaula en la edad adulta (Benavides, Guénet, 2003, p. 312).

Su proceso de alimentación es cíclico y presenta un pico máximo durante el periodo de oscuridad, de la misma forma el mayor consumo de agua se evidencia en la oscuridad. Comúnmente el ratón divide su caja en áreas específicas para comer, dormir, orinar y defecar. Las hembras antes al parto construyen un nido en el cual permanecen el tiempo necesario para el cuidado de sus crías (Benavides, Guénet, 2003, p. 313).

## CAPITULO II

### 2. MARCO METODOLOGICO

#### 2.1. Lugar de investigación

La investigación de tipo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de productos naturales y en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

#### 2.2. Recolección del material vegetal

La especie *Hypericum laricifolium* (Romerillo) se recolectó en estado de floración, en el Arenal, a 4.350 metros sobre el nivel del mar, en la provincia de Chimborazo.

#### 2.3. Identificación Botánica

La identificación botánica de la planta fue realizada por el Ing. Jorge Caranqui, botánico responsable del herbario de la ESPOCH, con número de vaucher ESPOCH 4339 (Riobamba – Ecuador).

#### 2.4. Equipos, Materiales y Reactivos

##### 2.4.1. Equipos

**Tabla. 4-2:** Equipos utilizados

Equipos	Procedimiento
Estufa de secado RedLine by Binder	Secado de la droga vegetal.
Molino de cuchillas Arthur H. Tomas C.O	Reducción de tamaño de la droga seca.

Balanza analítica HDM	Pesaje de las muestras en diferentes procedimientos.
Mufla Vulcan y SNOL	Incineración de la muestra seca y secado del extracto hidroalcohólico.
PH-metro	Medición del pH extracto hidroalcohólico
Refractómetro Baysch Y Lomb	Medición índice de refracción y grados Brix del extracto hidroalcohólico.
Rotavapor	Concentración del extracto.
Liofilizador Thermo	Liofilización del extracto.
Espectrofotómetro	Cuantificación de flavonoides y fenoles totales.
Laberinto en cruz elevado	Análisis de la actividad ansiolítica.
Cuarto claro/ oscuro	
Campo abierto	
Software	Procesamiento de datos.

**Realizado por:** Michele Godoy 2018

### 2.4.2. *Materiales*

**Tabla. 5-2:** Materiales utilizados en la parte práctica

<b>Materiales</b>	<b>Procedimiento</b>
Frascos ámbar de 50, 200 y 1000 mL	Maceración y almacenamiento de los extractos y conservación de los extractos a diferentes concentraciones a administrar
Crisoles de 10 mL	
Pinzas para crisoles	



Espátula	Controles de calidad muestra seca y extracto hidroalcohólico
Reverbero	
Vaso de precipitación 25 mL	
Vidrio reloj	
Capsula de porcelana	
Embudo	Tamizaje fitoquímico
Tubos de ensayo	
Pipetas de 1, 2, 5 y 10 mL	
Vaso de precipitación de 50 y 100 mL	
Pipetas de 1, 5 y 10 mL	Cuantificación de Flavonoides y Fenoles
Valones de aforo de 25 mL	
Tubos de ensayo	
Jeringas de 1 mL	Dilución y Administración de las diferentes concentraciones del extracto para la determinación de la actividad ansiolítica.
Cánula	
Franela	
Valones de aforo de 100 mL	
Frascos Ámbar de 120 mL	

**Realizado por:** Michele Godoy, 2018

### 2.4.3. Reactivos

**Tabla. 6-2:** Reactivos utilizados en los diferentes procedimientos

Reactivos	Procedimiento
Hexano	Preparación de los extractos
Éter	
Agua destilada	
Alcohol etanol al 70%	
Ácido clorhídrico al 10%	Control de calidad muestra seca
Ácido nítrico	
Reactivo de Sudan	Tamizaje fitoquímico
Ácido clorhídrico concentrado	
Reactivo de Dragendorff	
Reactivo de Mayer	
Reactivo de Wagner	
Reactivo de Bajet	
Reactivo de Borntrager	
Cloruro de sodio	
Reactivo de Libermann-Burchard	
Carbonato de sodio	
Reactivo de Fehling A y B	
Tricloruro férrico al 5%	
Cinta de magnesio metálico	

Alcohol amílico	Cuantificación de flavonoides y fenoles totales
Nitrito de sodio al 5%	
Cloruro de aluminio al 10%	
Hidróxido de potasio 1M	
Reactivo de Folin	
Carbonato de sodio al 7.5%	

Realizado por: Michele Godoy, 2018

## 2.5. Acondicionamiento del material vegetal

Se utilizó como material vegetal las partes aéreas de *Hypericum laricifolium*, especialmente las flores brotadas, las cuales fueron limpiadas para posteriormente someterlas al proceso de secado en la estufa RedLine by Binder a 60°C por 24 horas. Una vez seco el material vegetal, se molió en un molino de cuchillas giratorias Arthur H Thomas CO.

## 2.6. Análisis físico-químico de la planta seca. Parámetros de control de calidad

Los métodos de análisis físico-químicos permiten determinar y establecer la calidad de una droga vegetal (Kuklinski, 2009, pp. 32-35).

### 2.6.1. Determinación de cenizas totales

Pesar  $2 \pm 0.5$  g de la muestra seca y pulverizada en un crisol previamente tarado. Calentar suavemente aumentando la temperatura hasta carbonizar y posteriormente incinerar en un horno mufla a 700 o 750 °C durante dos horas y pesar, se repite el proceso pesando los crisoles cada 30 minutos, hasta que los pesos permanezcan constantes. Calcular los resultados con la siguiente fórmula (Kuklinski, 2009, pp. 32-35).

$$\%C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

*Donde:*

C (%) = cenizas totales.

M (g) = masa de crisol vacío.

M<sub>1</sub> = masa del crisol con muestra del ensayo.

M<sub>2</sub> = masa de crisol con la ceniza.

### ***2.6.2. Determinación de cenizas solubles en agua***

A las cenizas totales obtenidas en el primer ensayo, añadir de 15 a 20 mL de agua, tapar el crisol y hervir suavemente en un reverbero durante 5 minutos, filtrar la solución con papel filtro libre de cenizas. El filtro con el residuo transferir al crisol inicial, carbonizar e incinerar en un horno mufla a 700 o 750 °C durante 2 horas. Pesar y repetir el proceso hasta obtener pesos constantes. Los resultados se calculan utilizando la siguiente fórmula (Kuklinski, 2009, pp. 32-35).

$$\%Ca = \frac{M_2 - M_a}{M_1 - M} \times 100$$

*Donde:*

Ca= (%) cenizas solubles en agua.

M<sub>1</sub> = masa crisol con la muestra del ensayo (g).

M<sub>2</sub> = masa crisol con las cenizas totales (g).

M<sub>a</sub> = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g).

M = masa crisol vacío (g).

### **2.6.3. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico**

A las cenizas totales obtenidas en el primer procedimiento, se añade de 2 a 3 mL de ácido clorhídrico al 10%, tapan el crisol con un vidrio reloj y calentar a baño María durante 10 min, lavar el vidrio reloj con agua caliente y verter el contenido en el crisol. Filtrar la solución con papel filtro libre de cenizas, se lava el residuo con agua caliente hasta que el filtrado acidulado no muestre presencia de cloruros. El filtrado con el residuo desecar a una temperatura de 100 a 105 °C, transferir al crisol inicial e incinerar en un horno mufla a 700 o 750 °C durante 2h. Pesarse y repetir el proceso hasta tener pesos constantes, para obtener los resultados se aplica la siguiente fórmula (Kuklinski, 2009, pp. 32-35).

$$\%B = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Donde:

B= (%) cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

M= masa del crisol vacío.

M<sub>1</sub>= masa del crisol con la muestra de ensayo.

M<sub>2</sub>= masa del crisol con la porción de cenizas de ácido clorhídrico.

### **2.6.4. Determinación de humedad**

Pesar 2 ± 05 gramos de la muestra seca y triturada, colocar en una cápsula de porcelana y desecar a 105 °C durante 3h. Transcurrido el tiempo colocar la cápsula en la desecadora, dejar enfriar y pesar, colocar nuevamente en la estufa durante 1h y volver a pesar, repetir hasta obtener una masa constante. Los resultados se calculan mediante la siguiente fórmula (Kuklinski, 2009, pp. 32-35).

$$\%H = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Donde:

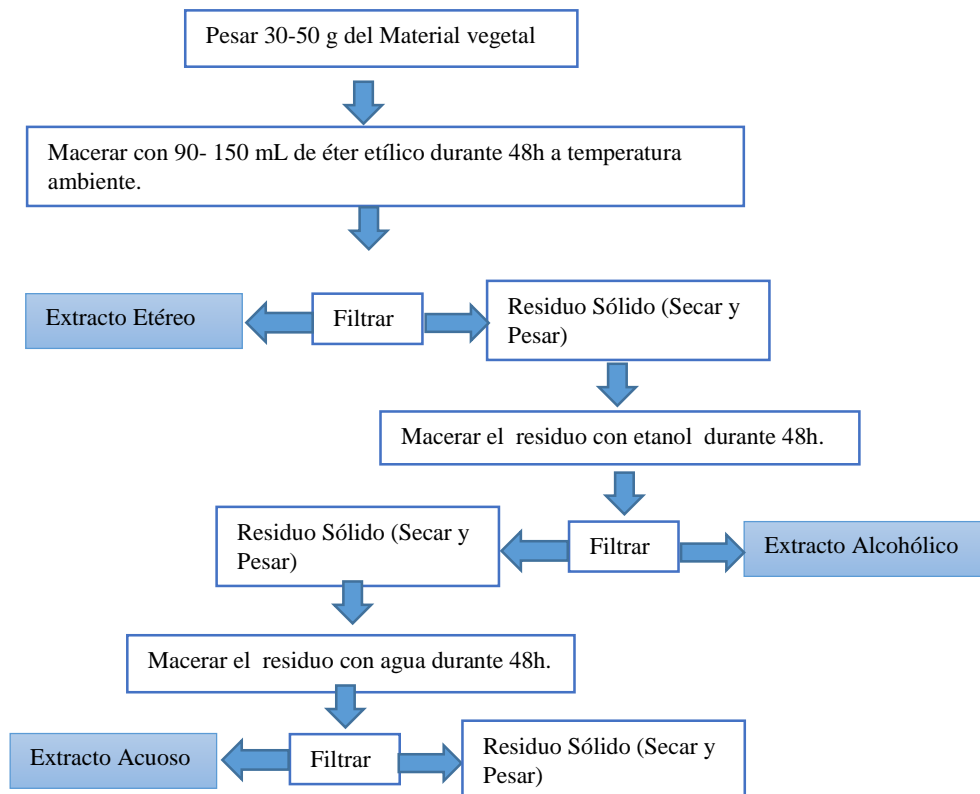
H= porcentaje de pérdida en peso por desecación.

M= masa de cápsula vacía.

M<sub>1</sub>= masa de cápsula con la muestra de la droga desecada.

M<sub>2</sub>= masa de la cápsula con la muestra de la droga

## 2.7. Elaboración Extractos Etéreo, Alcohólico y Acuoso

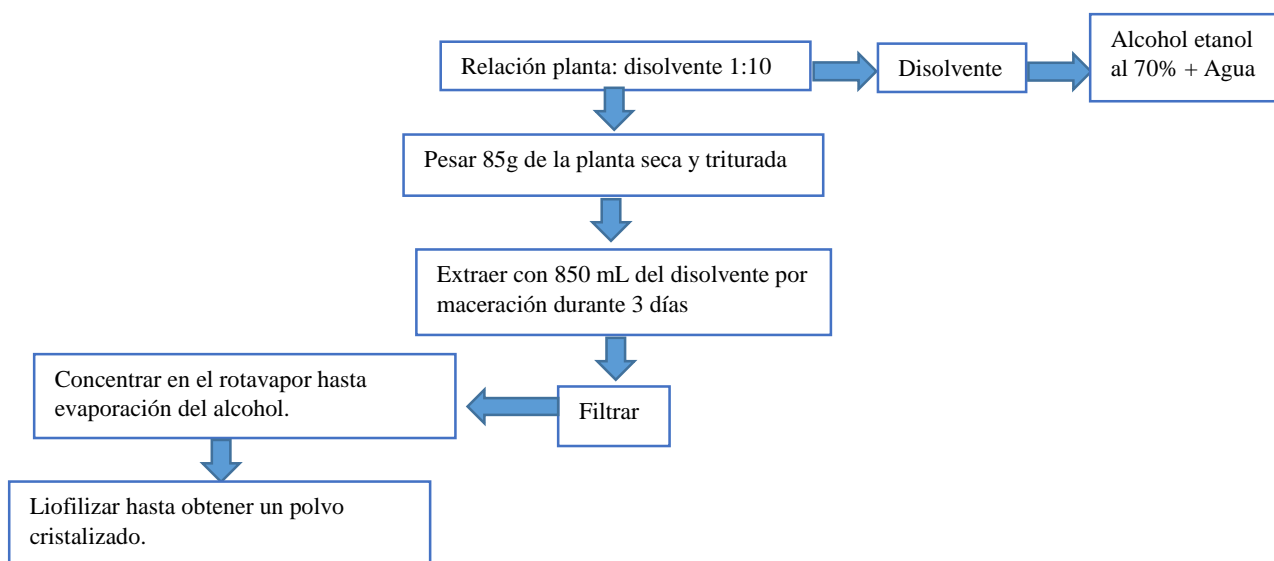


**Gráfico 1-2:** Esquema de la elaboración de los extractos Etéreo, Alcohólico y Acuoso

**Fuente:** (Kuklinski, 2009, pp. 39-41)

**Realizado por:** Michele Godoy, 2018

## 2.8. Elaboración extracto hidroalcohólico



**Gráfico 2-2:** Esquema de la elaboración del extracto hidroalcohólico

Fuente: (Kuklinski, 2009)

Realizado por: Michele Godoy, 2018

## 2.9. Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico o *Screening* fitoquímico permite determinar cualitativamente los principales grupos constituyentes químicos presentes en una planta, tanto libres como en forma de glicósidos y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Para esto generalmente se usan tres tipos de extractos: etéreo, alcohólico y acuoso, su forma de elaboración se describe en el gráfico 1-2. (Sharapin, 2000, p. 198).

**Tabla. 7-2:** Reacciones a realizar en el extracto etéreo

Extracto etéreo	Ensayo	Metabolito secundario
	Ensayo de Sudan	Aceites y grasas
	Ensayo de Baljet	Lactonas y Cumarinas
	Ensayo de Dragendorff	Alcaloides
	Ensayo de Mayer	Alcaloides
	Ensayo de Wagner	Alcaloides

	Ensayo de Libermann-Bucharl	Triterpenos-Esteroides
--	-----------------------------	------------------------

**Fuente:** (Kuklinski, 2009).

**Realizado por:** Michele Godoy, 2018

**Tabla. 8-2:** Reacciones a realizar en el extracto alcohólico

<b>Extracto alcohólico</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Metabolito secundario</b>
	Ensayo de Catequinas	Catequinas
	Ensayo de Resinas	Resinas
	Ensayo de Fehling	Az. Reductores
	Ensayo de Baljet	Lactonas
	Ensayo de Libermann-Bucharl	Triterpenos-Esteroides
	Ensayo de Cl <sub>3</sub> Fe	Fenoles y Taninos
	Ensayo de Espuma	Saponinas
	Ensayo de Ninhidrina	Aminoácidos
	Ensayo de Borntrager	Quinonas
	Ensayo de Shinoda	Flavonoides
	Ensayo de Antocianidina	Antocianos
	Ensayo de Dragendorff	Alcaloides
Ensayo de Mayer	Alcaloides	
Ensayo de Wagner	Alcaloides	

**Fuente:** (Kuklinski, 2009).

**Realizado por:** Michele Godoy, 2018



**Tabla. 9-2: Reacciones a realizar en el extracto acuoso**

<b>Extracto acuoso</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Metabolito secundario</b>
	Ensayo de Fehling	Az. Reductores
	Ensayo de $Cl_3Fe$	Fenoles y Taninos
	Ensayo de Espuma	Saponinas
	Ensayo de Shinoda	Flavonoides
	Ensayo de Dragendorff	Alcaloides
	Ensayo de Mayer	Alcaloides
	Ensayo de Wagner	Alcaloides
	Ensayo de Mucílagos	Mucílagos
	Ensayo de Principios amargos	Principios amargos

**Fuente:** (Kuklinski, 2009).

**Realizado por:** Michele Godoy, 2018

## **2.10. Control de calidad del extracto Hidroalcohólico**

### ***2.10.1. Características Organolépticas***

Se determina características de: color, olor, sabor y aspecto, mediante la degustación de una mínima cantidad del extracto.

### ***2.10.2. Determinación de densidad relativa***

La obtención de la densidad relativa se realiza con la ayuda de un picnómetro, para lo cual se pesa el picnómetro seco y vacío, posteriormente se debe pesar el picnómetro lleno con agua destilada a 25°C, finalmente volver a pesar el picnómetro lleno con el extracto a 25°C, obtener el resultado con la aplicación de la siguiente fórmula:

$$D = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

Donde:

M= Peso del picnómetro vacío.

M<sub>1</sub>= Peso del picnómetro con muestra del extracto.

M<sub>2</sub>= Peso del picnómetro con agua.

### ***2.10.3. Determinación del índice de refracción***

El ensayo se realiza en un refractómetro, colocando una gota de la muestra del extracto sobre el prisma y por medio del espejo del instrumento se enfoca la luz que incide sobre la entrada del prisma, dando un valor de refracción.

### ***2.10.4. Determinación de pH***

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

### ***2.10.5. Determinación de sólidos totales***

En una cápsula previamente tarada se añade una alícuota de 5ml de extracto hidroalcohólico y se evapora en baño maría. Posteriormente se coloca la cápsula dentro de la estufa a 105°C por 3 horas. Pasado este tiempo se lleva la cápsula al desecador hasta temperatura ambiente y se pesa hasta que se mantenga constante. Los resultados se obtienen con la ayuda de la siguiente fórmula:

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

Donde:

ST= sólidos totales de la muestra.

P= masa de la cápsula vacía (tarada).

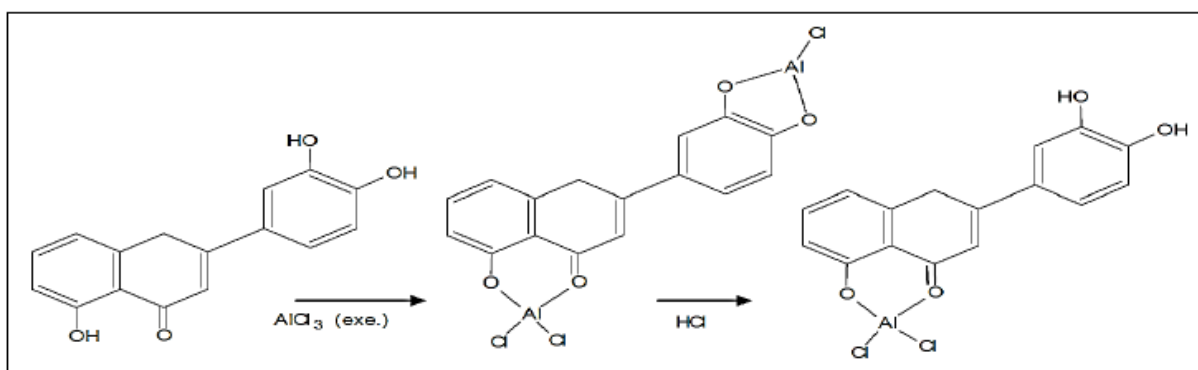
Pr= masa de la cápsula con el residuo.

V= volumen de la alícuota del ensayo.

## 2.11. Cuantificación de Flavonoides totales (Método de $\text{AlCl}_3$ )

### 2.11.1. Fundamento

El  $\text{AlCl}_3$  anhidro forma quelatos con flavonoides orto-dihidroxisilados, 3-hidroxisilados y 5-hidroxisilados en medio básico. Los quelatos presentan una coloración rosada indicando la presencia de flavonoides. Los valores de flavonoides totales se expresan como mg del flavonoide empleado como estándar equivalente por gramo de muestra (Palomino, Lady, et al, 2009, pp. 1-8).



**Figura. 11-2:** Reacción de quelación del ión  $\text{Al}^{3+}$  con flavonoides

Fuente: (Markhan, 1968).

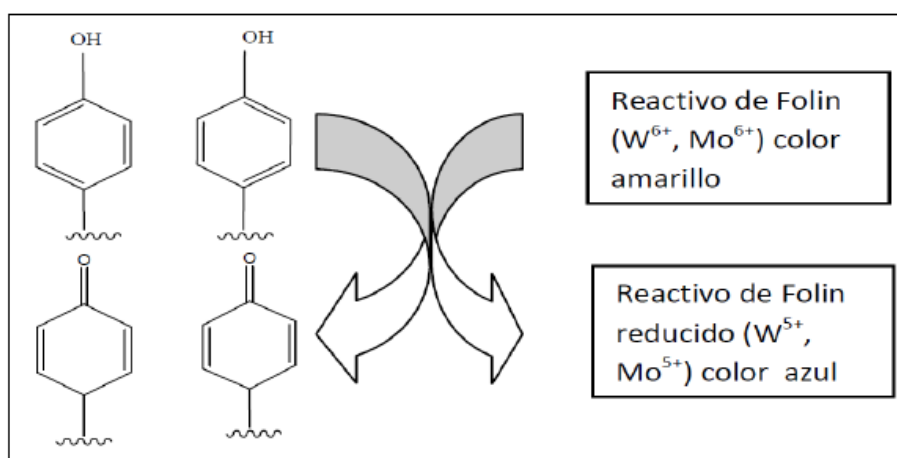
### 2.11.2. Procedimiento

Tomar una alícuota de la muestra (1 mL), añadir 4 mL de agua destilada junto con 0,3 mL de Nitrito de sodio al 5%, esperar 5 minutos y colocar 0,3 mL de Cloruro de Aluminio al 10%. Vortear un minuto, más cinco minutos en completa oscuridad. Añadir 2 mL de  $\text{NaOH}$  1M, homogenizar y leer. Las lecturas se realizan a una medición de 510 nm (Palomino, Lady, et al, 2009, pp. 1-8).

## 2.12. Cuantificación de compuestos fenólicos (Micro método de Folin- Ciocalteu)

### 2.12.1. Fundamento

Los compuestos fenólicos son oxidados por el reactivo de Folin-Ciocalteu. El cual contiene una mezcla de ácido fosfotúngstico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) y el ácido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), que se reduce por oxidación de fenoles, dando como resultado óxidos de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y de molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), de color azul. La coloración azul que se produce es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes, y posee una absorción máxima a 765 nm (Palomino, Lady, et al, 2009, pp. 1-8)



**Figura. 12-2:** Reacción de Folin- Ciocalteu.

Fuente: (Markhan, 1968).

### 2.12.2. Procedimiento

Tomar una alícuota de la muestra (1 mL) y añadir 15 mL de agua destilada junto con 1,25 mL de reactivo de Folin, esperar 8 minutos y colocar 3,75 mL de Carbonato de sodio 7,5% y aforar a 25 mL con agua destilada. Vortear por 1 minuto, dejar 2 horas en completa oscuridad, y leer. Las lecturas se realizan a una medición de 765 nm (Palomino, Lady, et al, 2009).

## 2.13. Evaluación de la actividad ansiolítica

Los biomodelos empleados en este estudio fueron ratones *Mus musculus* machos, adquiridos del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación (INSPI), con una edad promedio de 21 días y un peso de 30 – 40 gramos, los cuales pasaron por un proceso de adaptación anterior a la dosificación, el

cual consiste cambiar su alimentación y condiciones ambientales las cuales fueron establecidas según el protocolo de investigación del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, para determinar la actividad ansiolítica, se realizó pruebas neurológicas no condicionadas.

Para la investigación, se dividió a la población de ratones en 6 grupos, que se identificaban según la concentración del extracto de *Hypericum laricifolium* a administrar, Clonazepam (Grupo control) y blanco, tal como se detalla en la siguiente tabla.

**Tabla. 10-2:** Descripción de grupos formados para la administración

Designación de grupo	Concentración a administrar	N° de Ratones	Dosis a administrar
G1	Blanco	7	50 mL
G2	Control (Clonazepam)	7	25 mL
G3	25 PPM	7	50 mL
G4	50 PPM	7	50 mL
G5	100 PPM	7	50 mL
G6	200 PPM	7	50 mL

Realizado por: Michele Godoy, 2018

Las concentraciones del extracto, se administraron en dosis STAT al 100% por vía oral, teniendo una duración del tratamiento de 3 semanas, una semana en cada prueba. A cada grupo de ratones se realizó pruebas neurológicas, utilizando tres equipos electrónicos de medición (campo abierto, cuarto claro/oscuro, laberinto en cruz elevado) 30 min después de la administración de la dosis. Obteniendo los resultados mediante un software de procesamiento de imagen denominado Itopi para los equipos de medición cuarto claro/oscuro y laberinto en cruz elevado, y el software Emis para el equipo de medición campo abierto.

### ***2.13.1. Equipo Electrónico de medición Laberinto en Cruz Elevado***

El equipo electrónico de medición Laberinto en Cruz Elevado está elaborado en polipropileno con 4 brazos perpendiculares de 30 x 10 cm y 2 brazos con paredes laterales de 20 cm de altura, además esta elevado por un soporte de 38 cm en cada brazo. Cuenta también con una estructura metálica rodeado de

una cortina que impide el paso de la luz y dentro se encuentra una cámara de video, este equipo cuenta con un software llamado ITOPI.

#### *2.13.1.1. Procedimiento*

De acuerdo con las especificaciones del POE que se encuentra en el área de ensayos del Bioterio, se arma el equipo y se desinfecta con etanol al 10% antes y después de utilizar. Se enciende la cámara y se conecta mediante una red WIFI al computador. Cuando todo está listo se coloca al ratón en el centro del equipo, se abandona la habitación, y se comienza a grabar, observando el comportamiento del roedor por un tiempo de 5 minutos. Una vez culminada la prueba se deja de grabar, el video se procesa en la aplicación Itopi, con un umbral de 0.1 a 0.2 dependiendo de la luz.

#### *2.13.1.2. Parámetros por medir*

**Tiempo de permanencia en los brazos abiertos:** Mayor tiempo de permanencia indica que el roedor no se encuentra ansioso.

**Tiempo de permanencia en los brazos cerrados:** El roedor presenta ansiedad ya que permanece en una zona de confort.

**Tiempo de permanencia en el centro:** El roedor intenta salir y explorar nuevos ambientes.

**Número de entradas a los brazos abiertos:** El ratón presenta mejor locomoción a mayor número de entradas.

**Número de entradas a los brazos cerrados:** El ratón presenta mejor locomoción a mayor número de entradas.

**Número de entradas al centro:** El ratón presenta mejor locomoción a mayor número de entradas.

**Distancia recorrida:** El roedor tiende a recorrer más cuando esta relajado, indicando mejor locomoción

**Velocidad media:** A mayor velocidad mejor locomoción.

### **2.13.2. Equipo Electrónico de medición cuarto claro-oscuro**

El equipo de medición cuarto claro-oscuro consiste en una caja elaborada en acrílico con dimensiones totales de 44 x 21 cm, con paredes de 21cm de altura, y dividido en dos compartimentos de 29 x 21 cm la sección clara y de 15 x 21cm la oscura, separadas por una pared con una ranura que permite los cruces del roedor entre las dos secciones. Además, de un soporte metálico regulable y recubierto de una cortina que evita el paso de la luz, dentro del cual se encuentra una cámara de video en la parte superior. Este equipo tiene un software de procesamiento de imagen denominado ITOPI.

#### **2.13.2.1. Procedimiento**

Según las especificaciones del POE ubicado en el área de ensayos del Bioterio, se arma el equipo y se desinfecta con etanol al 10% antes y después de utilizar el mismo. Se enciende la cámara y se conecta mediante una red WIFI al computador. Cuando todo está listo se coloca al ratón en la parte clara del equipo, se abandona la habitación, y se comienza a grabar, observando el comportamiento del roedor por un tiempo de 10 minutos. Una vez culminada la prueba se deja de grabar, el video se procesa en la aplicación Itopi, con un umbral de 0.4 a 0.5.

#### **2.13.2.2. Parámetros por medir**

**Tiempo de permanencia en el cuarto claro:** Mayor tiempo de permanencia del roedor en el cuarto claro, quiere decir que se encuentra relajado y explora ambientes luminosos.

**Tiempo de permanencia en el cuarto oscuro:** Mayor tiempo de permanencia del roedor en el cuarto oscuro, significa que está en un estado de ansiedad y evitan la exposición.

**Tiempo de permanencia en la zona de cruce:** El roedor intenta de salir a explorar ambientes nuevos, sinónimo de relajación.

**Número de entradas al cuarto claro:** El ratón presenta mejor locomoción a mayor número de entradas.

**Número de entradas al cuarto oscuro:** El ratón presenta mejor locomoción a mayor número de entradas.

**Distancia recorrida:** El ratón presenta mejor locomoción con mayor distancia recorrida.

**Velocidad media:** El ratón presenta mejor locomoción con mayor velocidad.

### ***2.13.3. Equipo Electrónico de medición campo abierto***

El equipo de campo abierto, consta de una caja de polipropileno con una dimensión de 68 x 68 cm de ancho y con paredes de 45 cm de altura. También posee una estructura de metal, rodeada de una cortina y dentro de esta en la parte superior una cámara de video. Este equipo cuenta con un software de procesamiento de imagen denominada Emis.

#### ***2.13.3.1. Procedimiento***

De acuerdo a las especificaciones del POE que se encuentra en el área de ensayos del Bioterio, se arma el equipo y se realiza una desinfección con etanol al 10% antes y después de utilizar el equipo. Se enciende la cámara y se conecta mediante una red WIFI al computador. Cuando todo está listo se coloca al ratón en el centro del equipo, se abandona la habitación, se comienza a grabar y se observa el comportamiento del animal por un tiempo de 10 minutos. Una vez acabado este tiempo se deja de grabar, el video se procesa en la aplicación Emis.

#### ***2.13.3.2. Parámetros por medir***

**Tiempo en el centro:** El mayor tiempo de permanencia, indica que el roedor se encuentra relajado y explorando ambientes nuevos.

**Tiempo en el intermedio:** El mayor tiempo de permanencia indica que el roedor relajado por lo tanto explora ambientes luminosos cerca del centro

**Tiempo en los laterales:** El mayor tiempo de permanencia indica que el roedor se encuentra ansioso, por lo cual busca permanecer en lugares donde se siente seguro.

**Tiempo en las esquinas:** El mayor tiempo de permanencia indica que el roedor se siente ansioso y busca estar en zonas donde se siente seguro y menos expuesto.

**Número de Defecaciones:** El mayor número de defecaciones indican ansiedad.

**Número de Elevaciones:** El mayor número de elevaciones indican que el roedor se encuentra ansioso.



**Distancia recorrida:** El ratón presenta mejor locomoción a mayor distancia recorrida.

**Velocidad media:** El ratón presenta mejor locomoción a mayor velocidad.

## 2.14. Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas para el análisis de los datos se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS24, en primera instancia se verifica que los datos obtenidos en el análisis de ansiedad cumplan con los parámetros principales para un análisis de estadística paramétrica, los cuales son: distribución normal y homogeneidad de varianzas.

Para probar si los datos presentan una distribución normal, se realiza la prueba estadística de Kolmogorow-Smirnov ya que se tiene datos mayores a 30, para evaluar la igualdad de varianzas se utiliza la prueba de Levene, para verificar que los datos cumplen con estas características el nivel de significancia debe ser mayor a 0.01.

En el análisis de los diferentes tratamientos (dosis), se utiliza la prueba paramétrica de hipótesis ANOVA, obteniendo como hipótesis que:

Hipótesis nula ( $H_0$ ): Las medias de los parámetros en los diferentes tratamientos son iguales.

Hipótesis de investigación ( $H_a$ ): Existe al menos una pareja de medias de parámetros que son diferentes.

Cuando el resultado del test ANOVA obtenido en los diferentes parámetros, de los 6 tratamientos, indica en la mayoría de los casos valores menores que el nivel de significancia, significa que, existe al menos una pareja de medias que son diferentes. Para esto se utiliza el test post hoc Tukey para establecer cuáles son las parejas de medias diferentes.

En el test post hoc Tukey, la formación de sub grupos homogéneos en la mayoría de parámetros, permitirá establecer que los datos obtenidos en dichos sub grupos son más confiables a la hora de tomar una decisión, tomando en cuenta las probabilidades de los sub grupos formados.

## CAPITULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Control de calidad de las partes áreas de la planta *Hypericum laricifolium* (Romerillo)

##### 3.1.1. Determinación de humedad

**Tabla. 11-3:** Resultados de la determinación de humedad.

% Humedad	Especificación (USP 35)
9,33 ± 0.00	Hasta 14%

Realizado por: Michele Godoy, 2018

##### 3.1.2. Determinación de cenizas

**Tabla. 12-3:** Resultados de la determinación de cenizas totales, cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico.

	Cenizas Totales (% en masa)	Cenizas Solubles en Agua (% en masa)	Cenizas Insolubles en HCl (% en masa)
	2,87 ± 0,00	1,80 ± 0,50	0,80 ± 0,10
<b>Especificaciones*</b>	Hasta 12%	Hasta 7%	Hasta 5%

Realizado por: Michele Godoy, 2018

\* USP 35

##### 3.1.3. Discusión de resultados

En las tablas 11-3 y 12-3 se observan los resultados del control de calidad realizado a la planta seca, obteniendo resultados de humedad (9.33 %), cenizas totales (2.87 %), cenizas solubles en agua (1.80 %) y cenizas insolubles en HCl (0.80 %), valores que se encuentran dentro de las especificaciones de acuerdo a la USP 35, este ensayo indica la calidad de la droga cruda. Debido que el exceso de agua en

las drogas vegetales evitan su conservación, estabilidad y promueve el crecimiento bacteriano, así como la presencia de hongos.

Las cenizas totales nos dan a conocer la presencia de materia extraña y sales minerales presentes en el material vegetal, así como la determinación de cenizas solubles en agua permiten determinar la cantidad de sales solubles en agua, mientras que las cenizas insolubles en ácido clorhídrico determinan la cantidad de sílice o arena en el material vegetal.

Según los datos obtenidos en las diferentes determinaciones del control de calidad, todos los parámetros están dentro de los límites establecidos, por lo tanto el material vegetal está en óptimo estado para su utilización en los diferentes ensayos.

### 3.2. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico determina cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios, mediante pruebas colorimétricas o formación de precipitados.

**Tabla. 13-3:** Resultados del ensayo fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuso.

<b>Extracto Etéreo</b>		
<b>Ensayo</b>	<b>Metabolito</b>	<b>Resultado</b>
Sudan	Aceites y Grasas	+++
Dragendorff	Alcaloides	-
Mayer	Alcaloides	-
Wagner	Alcaloides	-
Baljet	Lactonas y Cumarinas	-
Liebermann-Burchard	Triterpenos y/o Esteroides	-
<b>Extracto Alcohólico</b>		
<b>Ensayo</b>	<b>Metabolito</b>	<b>Resultado</b>
Catequinas	Catequinas	++

Resinas	Resinas	++
Fehling	Azúcares reductores	++
Baljet	Lactonas y Cumarinas	++
Liebermann-Burchard	Triterpenos y/o Esteroides	+++
Espumas	Saponinas	-
Bortrager	Quinonas	++
Shinoda	Flavonoides	+++
Antocianidina	Flavonoides	+++
Dragendorff	Alcaloides	+
Mayer	Alcaloides	+
Wagner	Alcaloides	+
Cloruro Férrico (FeCl <sub>3</sub> )	Fenoles / Taninos	+++
<b>Extracto Acuoso</b>		
<b>Ensayo</b>	<b>Metabolito</b>	<b>Resultado</b>
Dragendorff	Alcaloides	+
Mayer	Alcaloides	+
Wagner	Alcaloides	+
FeCl <sub>3</sub>	Taninos	+++
Shinoda	Flavonoides	+++
Fehling	Azúcares reductores	++
Espumas	Saponinas	-
Mucílagos	Mucílagos	-

<b>Interpretación</b>	- No presencia
	+ Baja presencia
	++ Presencia
	+++ Alta Presencia

### 3.2.1. *Discusión de resultados*

La tabla 13-3 representa los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de las flores secas de *Hypericum laricifolium* demostrando presencia de metabolitos secundarios como: aceite y grasas, triterpenos y esteroides, flavonoides, fenoles y taninos, así como la presencia de catequinas, resinas, azúcares reductores, lactonas, cumarinas, quinonas y principios amargos, de la misma forma baja presencia de alcaloides.

La presencia de flavonoides y fenoles presentes en los extractos alcohólico y acuoso podría, indica que el material vegetal presenta actividades biológicas tales como: efecto diurético, cardioprotector, antimicrobiano, antiviral, tratamiento en enfermedades neurodegenerativas, anticancerosos, ansiolíticos y otros. Lo cual vuelve a estos metabolitos compuestos de gran importancia en investigaciones para ansiolíticos (Cea, R, 2013, pp. 15-25).

En los extractos etanólico y alcohólico, se observó la presencia de triterpenos y esteroides. Los triterpenos poseen cualidades antioxidantes y hormonales, los esteroides tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias (Cea, R, 2013, pp. 15-25).

Los alcaloides, presentes en los extractos podrían, actividad simpaticomimética y alucinógena, además de intervenir en las reacciones principales del metabolismo celular, generalmente sobre el sistema nervioso central (Cea, R, 2013, pp. 15-25).

La variedad de metabolitos presentes en la planta *Hypericum laricifolium* la vuelven de gran importancia para investigación, ya que cada metabolito presenta actividades diferentes que potencian el uso de esta planta, la misma que ha sido utilizada de manera ancestral.

### 3.3. Control de calidad del extracto hidroalcohólico de *Hypericum laricifolium*

#### 3.3.1. Pruebas organolépticas

**Tabla. 14-3:** Resultados de las pruebas organolépticas del extracto de las flores de *Hypericum laricifolium*

Parámetro	Extracto hidroalcohólico de las flores de <i>Hypericum laricifolium</i>
Olor	Herbal propio de la planta con notas de alcohol
Color	Amarillo rojizo
Aspecto	Líquido ligeramente oscuro
Sabor	Amargo algo astringente

Realizado por: Michele Godoy, 2018

#### 3.3.2. Parámetros físicos

**Tabla. 15-3:** Resultados de los parámetros físicos del extracto hidroalcohólico de las flores de *Hypericum laricifolium*

Parámetros	Extracto hidroalcohólico de las flores de <i>Hypericum laricifolium</i>
pH	5.88
Índice de refracción	1.365
°Brix	20.5

<b>Densidad Relativa</b>	0.95 g/mL
<b>Sólidos totales (%)</b>	3.36

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.3.3. *Discusión de resultados*

En las tablas 14-3 y 15-3 se encuentran los resultados de las pruebas de calidad al extracto hidroalcohólico de las flores de *Hypericum laricifolium*, en los ensayos organolépticos el extracto presentó un olor herbal ligeramente alcohólico, un color amarillo oscuro, un aspecto líquido oscuro y sabor amargo algo astringente, características propias de las flores de la planta.

En la determinación del pH del extracto, el resultado fue de 5.88, un pH ligeramente ácido, ya que el extracto presenta metabolitos secundarios tales como: taninos, flavonoides, quinolonas, los cuales poseen características de ácidos débiles que hacen que el extracto presente dicho pH.

El resultado del índice de refracción, fue de 1.365, mayor al índice de refracción del agua con la que se comparó, lo cual indica la presencia de sustancias disueltas en el extracto.

La densidad relativa del extracto fue de 0.95 g/mL, mayor que la densidad del etanol (0.789 g/mL) y menor que la densidad del agua (1 g/mL) empleados como solventes, que indica la presencia de sustancias disueltas en dicho extracto.

En el porcentaje de sólidos totales del extracto, se obtuvo un resultado de 3.36%, según lo indicado en la farmacopea francesa el porcentaje no debe ser menor a 1.20, señalando que existiría una cantidad considerable de metabolitos y una buena solubilidad.

### 3.4. Cuantificación de Flavonoides totales (Método de AlCl<sub>3</sub>)

La determinación de flavonoides se realizó mediante el método colorimétrico de tricloruro de aluminio, tomando como patrón de referencia a la quercetina, obteniendo la siguiente curva de calibración:

$$y = 0,0014 x + 0,0144.$$

**Tabla. 16-3:** Resultados de la determinación de Flavonoides Totales del extracto hidroalcoholico de *Hypericum laricifolium*

FLAVONOIDES TOTALES		
SUSTANCIA ANSIOLÍTICA	mg Equivalentes de Quercetina/g extracto seco	g Equivalentes de Quercetina/100g de extracto seco (%EQFT)
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>Hypericum laricifolium</i>	14,61 ± 0,019	1,461 ± 19,14

Realizado por: Michele Godoy, 2018

#### 3.4.1. Discusión de resultados

En la tabla 16-3, se observa los resultados obtenidos en la cuantificación de flavonoides totales presentes en el extracto hidroalcohólico de *Hypericum laricifolium*, los cuales fueron, 14,61 mg de equivalentes de Quercetina/ g de extracto seco, es decir, 1, 461 g de Equivalentes de Quercetina/ 100g de extracto seco (%EQFT), estos valores son de gran relevancia ya que los flavonoides podrían ser los metabolitos responsables del efecto ansiolítico, la cantidad de flavonoides presentes puede variar dependiendo del sitio y la época de recolección.



### 3.5. Cuantificación de compuestos fenólicos (Micro método de Folin- Ciocalteau)

La cuantificación de fenoles totales se realizó mediante el método Folin-Ciocalteu, utilizando como estándar al ácido gálico, para la obtener la siguiente curva de calibración:  $y = 0,0014x + 0.0144$  con un  $R^2$  de 0.999

**Tabla. 17-3:** Resultados de la cuantificación de fenoles totales del extracto hidroalcohólico de *Hypericum laricifolium*

FENOLES TOTALES		
SUSTANCIA ANSIOLÍTICA	mg Equivalentes de Ácido Gálico/g de extracto seco	g Equivalentes de Ácido Gálico/100g de extracto seco (%EQFT)
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>Hypericum laricifolium</i>	14,48 ± 1,53	1,448± 0.001

Realizado por: Michele Godoy, 2018

#### 3.5.1. Discusión de resultados

En la tabla 17-3 se encuentran los resultados obtenidos en la cuantificación de fenoles totales presentes en el extracto hidroalcohólico de *Hypericum laricifolium*, al realizar los cálculos respectivos, se obtuvo, 14,48 mg de Equivalentes de Ácido Gálico/ g de extracto seco, lo cual representa, 1,448 g de Equivalentes de Ácido Gálico/ 100 g de extracto seco (%EQFT). Estos resultados nos ayudan a considerar las actividades farmacológicas que posee este extracto, es decir su actividad ansiolítica principalmente.

### 3.6. Análisis de la actividad ansiolítica

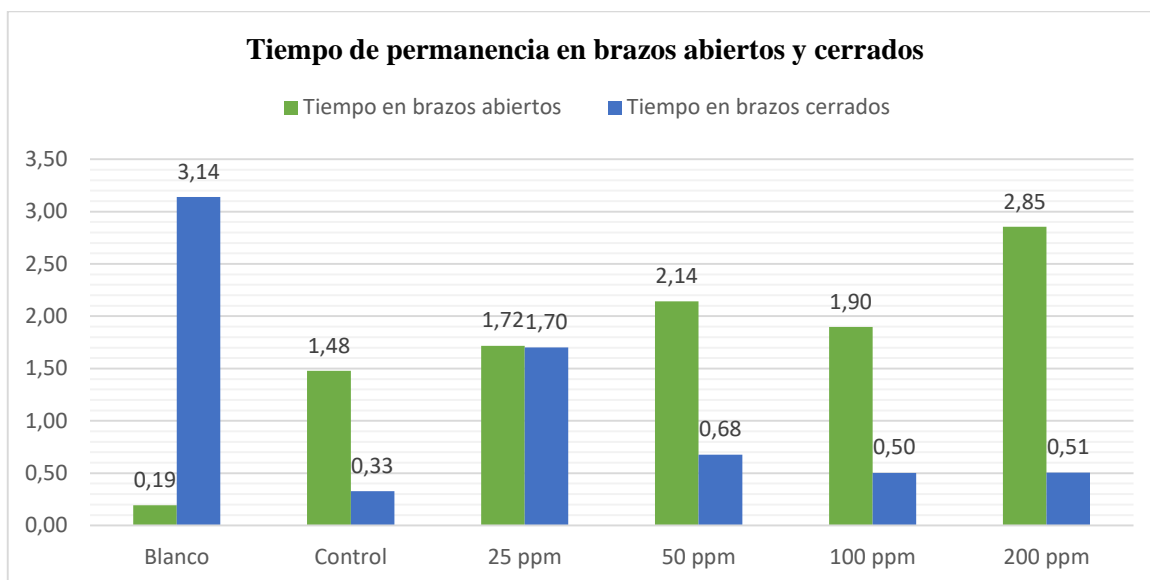
#### 3.6.1. Equipo electrónico Laberinto en cruz elevado

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

**Tabla. 18-3:** Resultado de la permanencia en los brazos abiertos y cerrados en minutos

Grupos	Tiempo en brazos abiertos	Tiempo en brazos cerrados
Blanco	0,19	3,14
Control	1,48	0,33
25 ppm	1,72	1,70
50 ppm	2,14	0,68
100 ppm	1,90	0,50
200 ppm	2,85	0,51

Realizado por: Michele Godoy, 2018



**Gráfico 3-3:** Tiempo de permanencia en brazos abiertos y cerrados comparados en los diferentes tratamientos

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.1.2. Discusión de resultados

En la tabla 18-3, se observa el tiempo promedio (minutos) de permanencia de los roedores en los brazos abiertos y cerrados, mientras que en el gráfico 3-3 se observa una comparación entre el tiempo de permanencia y las diferentes dosis administradas, obteniendo como resultado que, existe una mayor permanencia en los brazos abiertos de los ratones con tratamiento, de igual forma este tiempo se incrementa a medida que la dosis sube, por lo tanto los mayores tiempos de permanencia son de las dosis de 50, 100 y 200 ppm.

Mientras que aquellos ratones que no recibieron el extracto permanecen mayor tiempo en los brazos cerrados, siendo un indicativo de estrés o ansiedad. A dosis de 25 ppm, los animales de experimentación presentaron un tiempo de permanencia similar tanto en los brazos abiertos como en los brazos cerrados.

**Tabla. 19-3:** Análisis estadístico ANOVA, tiempo brazos abiertos y cerrados

ANOVA					
Tiempo brazos abiertos					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	97972,923	5	19594,585	3,553	,010
Dentro de grupos	198516,317	36	5514,342		
Total	296489,239	41			

ANOVA					
Tiempo brazos Cerrados					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	151006,418	5	30201,284	10,941	,000
Dentro de grupos	99370,815	36	2760,300		
Total	250377,233	41			

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.1.3. Discusión de resultados

La tabla 19-3 representa los valores obtenidos al realizar el test ANOVA, indicando que las medidas son menores al nivel de significancia por lo tanto se concluye que existen diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla. 20-3:** Test estadístico de Tukey aplicado al tiempo de permanencia en brazos abiertos y cerrados

<b>Tiempo brazos abiertos</b>			
<b>HSD Tukey<sup>a</sup></b>			
<b>Tratamiento_1</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0.01</b>	
		<b>1</b>	<b>2</b>
Blanco	7	11,5267	
Control	7	88,6564	88,6564
25ppm	7	103,0926	103,0926
100ppm	7	113,8817	113,8817
50ppm	7	128,5370	128,5370
200ppm	7		171,2104
Sig.		,058	,320

<b>Tiempo brazos Cerrados</b>			
<b>HSD Tukey<sup>a</sup></b>			
<b>Tratamiento_3</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0.01</b>	
		<b>1</b>	<b>2</b>
Control	7	19,6328	
100ppm	7	30,2192	
200ppm	7	30,3541	
50ppm	7	40,5961	
25ppm	7	102,1280	102,1280
Blanco	7		188,3096
Sig.		,059	,043

Realizado por: Michele Godoy, 2018

#### 3.6.1.4. *Discusión de resultados*

De los resultados del tiempo de permanencia en los brazos abiertos (tabla 19-3), se considera la formación de sub grupos, por lo cual se aplica la prueba de Tukey, los resultados se representan en la tabla 20-3.

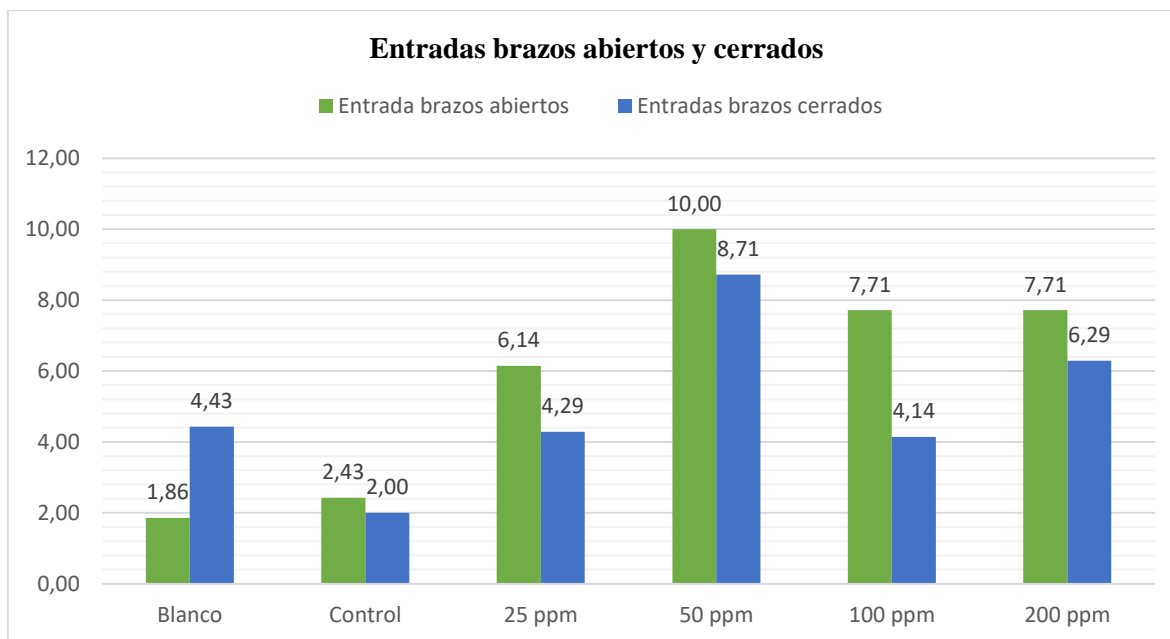
El sub grupo con mayor probabilidad en el tiempo de permanencia en brazos abiertos, es el sub grupo formado por el control y las dosis 25, 50, 100 y 200 ppm. En cuanto al tiempo de permanencia en brazos cerrados, se tiene la formación de dos sub grupos homogéneos. El sub grupo con mayor probabilidad, es el compuesto por el control junto con las dosis 50, 100 y 200 ppm, tomando en cuenta que, el control es el que, permanece mayor tiempo en los brazos abiertos y menor tiempo en los brazos cerrados, demostrando que las diferentes dosis presenta actividad ansiolítica.

#### 3.6.1.5. *Entradas brazos abiertos y cerrados*

**Tabla. 21-3:** Resultado del número de entradas a los brazos abiertos y cerrados

<b>Grupos</b>	<b>Entrada brazos abiertos</b>	<b>Entradas brazos cerrados</b>
Blanco	1,86	4,43
Control	2,43	2,00
25 ppm	6,14	4,29
50 ppm	10,00	8,71
100 ppm	7,71	4,14
200 ppm	7,71	6,29

Realizado por: Michele Godoy, 2018



**Gráfico 4-3:** Número de entradas a los brazos abiertos y cerrados.

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.1.6. *Discusión de resultados*

En el gráfico 4-3 y la tabla 21-3, se observa, el número de entradas a brazos abiertos y cerrados, obteniendo como resultados que el blanco tiene más número de entradas a los brazos cerrados en comparación de las entradas a los brazos abiertos. El grupo control y las dosis de 25, 50, 100 y 200 ppm presentan mayor número de entradas a los brazos abiertos que a los brazos cerrados, lo cual indica una mayor exploración y actividad locomotora del ratón.

**Tabla. 22-3:** Análisis estadístico ANOVA, Entradas brazos abiertos y cerrados.

ANOVA					
Entradas brazos abiertos					
	Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	362,690	5	72,538	4,469	,003
Dentro de grupos	584,286	36	16,230		
Total	946,976	41			

ANOVA					
Entradas Brazos Cerrados					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	182,119	5	36,424	1,850	,128
Dentro de grupos	708,857	36	19,690		
Total	890,976	41			

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.1.7. Discusión de resultados

En la tabla 22-3 se muestran los valores del test de ANOVA, respecto al número de entradas a los brazos abiertos y cerrados, en el primer caso el valor de p es menor al nivel de significancia, en el segundo caso es mayor. Se presentaron grupos por lo cual se realiza la prueba estadística de TUKEY.

**Tabla. 23-3:** Análisis Tukey para entradas brazos abiertos y cerrados

Entradas brazos abiertos			
HSD Tukey <sup>a</sup>			
Tratamiento_1	N	Subconjunto para alfa = 0.01	
		1	2
Blanco	7	1,8571	
Control	7	2,4286	2,4286
25ppm	7	6,1429	6,1429
100ppm	7	7,7143	7,7143
200ppm	7	7,7143	7,7143
50ppm	7		10,0000
Sig.		,096	,014

Entradas Brazos Cerrados		
HSD Tukey <sup>a</sup>		
Tratamiento_1	N	Subconjunto para alfa = 0.01

		<b>1</b>
Control	7	2,0000
100ppm	7	4,1429
25ppm	7	4,2857
Blanco	7	4,4286
200ppm	7	6,2857
50ppm	7	8,7143
Sig.		,075

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.1.8. *Discusión de resultados*

En la tabla 23-3 se observan los resultados de la prueba de TUKEY, en el número de entradas a los brazos abiertos se muestran la formación de dos subgrupos homogéneos. El subgrupo con mayor valor de significancia, está formado por blanco, control y las dosis 25, 100 y 200 ppm.

En tanto al número de entradas a los brazos cerrados se observa la formación de un subgrupo, formado por las cuatro diferentes dosis, más el blanco y control, estos resultados indican que la actividad locomotora es estadísticamente similar en todas.

### 3.6.1.9. *Distancia recorrida y Velocidad media en la prueba de laberinto en cruz elevado*

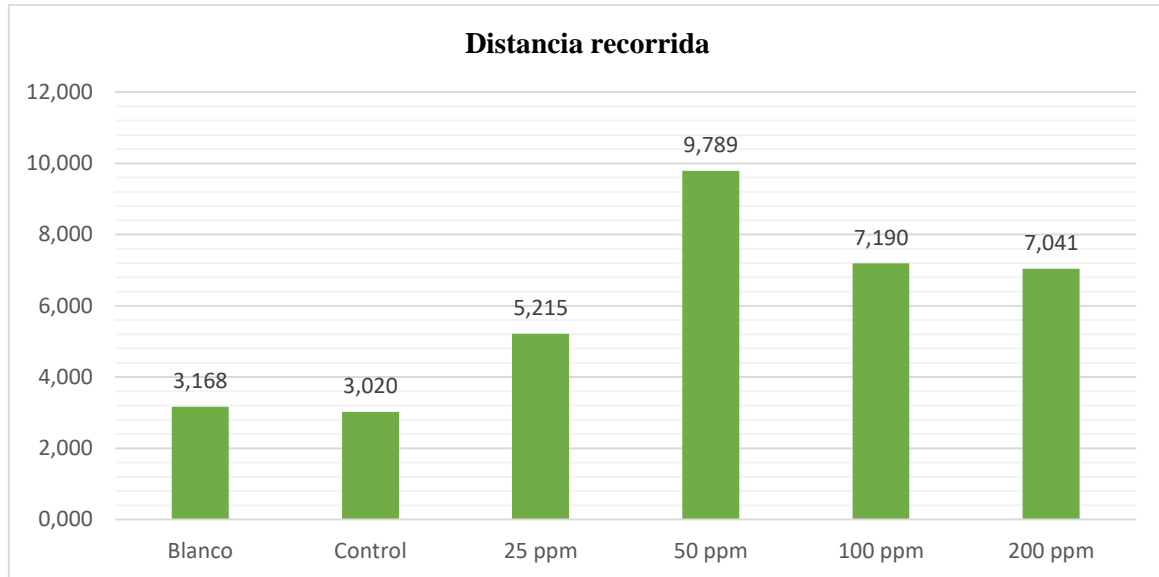
**Tabla. 24-3:** Resultados de la distancia recorrida y velocidad media

<b>Grupos</b>	<b>Distancia recorrida</b>	<b>Velocidad media</b>
Blanco	3,168	0,011
Control	3,020	0,010
25 ppm	5,215	0,017



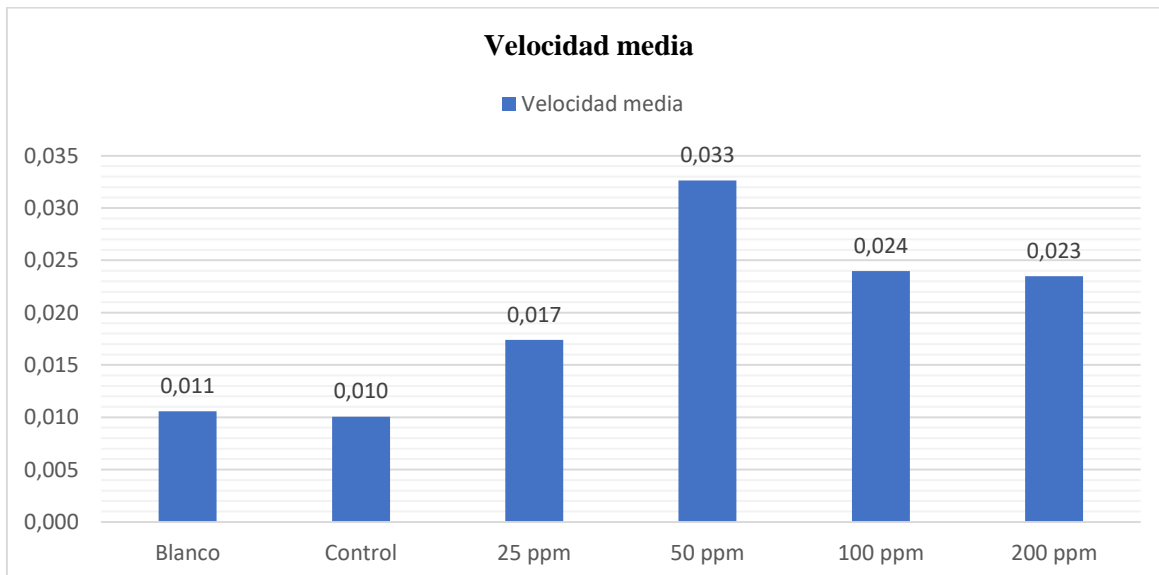
50 ppm	9,789	0,033
100 ppm	7,190	0,024
200 ppm	7,041	0,023

Realizado por: Michele Godoy, 2018



**Gráfico 5-3:** Resultado de la distancia recorrida en el test laberinto en cruz elevado.

Realizado por: Michele Godoy, 2018



**Gráfico 6-3:** Resultado de la velocidad media en el test laberinto en cruz elevado.

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.1.10. *Discusión de resultados*

En la tabla 24-3 se observan los datos de los diferentes tratamientos en cuanto a la velocidad media y distancia recorrida en el laberinto en cruz elevado. En los gráficos 5-3 y 6-3 se los presenta esquemáticamente.

Entre el blanco y la dosis de 200 ppm se observa incrementos en velocidad y distancia recorrida, con excepción del control que tiene valores de velocidad y distancia menores, estos valores son indicativos de la locomoción de los ratones, los valores más altos de velocidad y distancia recorrida son de las dosis 25, 50, 100 y 200 ppm.

**Tabla. 25-3:** Test ANOVA para distancia recorrida y velocidad media en la prueba de laberinto en cruz elevado

ANOVA					
Distancia Recorrida					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	240,203	5	48,041	4,969	,001
Dentro de grupos	348,035	36	9,668		
Total	588,238	41			

ANOVA					
Velocidad media					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,003	5	,001	4,969	,001
Dentro de grupos	,004	36	,000		
Total	,007	41			

Realizado por: Michele Godoy, 2018

3.6.1.11. *Discusión de resultados*

La tabla 25-3 representa los resultados del test de ANOVA en cuando a la distancia recorrida y velocidad media de los distintos tratamientos, en los dos casos el valor de p es menor al nivel de significancia, lo cual indica la formación de sub grupos y por lo tanto se debe realizar el análisis de TUKEY.

**Tabla. 26-3:** Resultados del test de Tukey para la distancia recorrida y velocidad media en el laberinto en cruz elevado

<b>Distancia Recorrida</b>			
<b>HSD Tukey<sup>a</sup></b>			
<b>Tratamiento_1</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0.01</b>	
		<b>1</b>	<b>2</b>
Control	7	3,0202	
Blanco	7	3,1679	
25ppm	7	5,2150	5,2150
200ppm	7	7,0409	7,0409
100ppm	7	7,1899	7,1899
50ppm	7		9,7888
Sig.		,148	,089

<b>Velocidad media</b>			
<b>HSD Tukey<sup>a</sup></b>			
<b>Tratamiento_1</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0.01</b>	
		<b>1</b>	<b>2</b>
Control	7	,0101	
Blanco	7	,0106	
25ppm	7	,0174	,0174
200ppm	7	,0235	,0235
100ppm	7	,0240	,0240
50ppm	7		,0326
Sig.		,148	,089

**Realizado por:** Michele Godoy, 2018

### 3.6.1.12. *Discusión de resultados*

En la tabla 26-3 se observan los resultados del test de TUKEY para la distancia recorrida y velocidad media en la prueba de laberinto en cruz elevado, de los diferentes tratamientos. Obteniendo la formación de dos subgrupos.

De los resultados correspondientes a la distancia recorrida y la velocidad media se obtuvo la formación de dos subgrupos en los dos parámetros, los cuales presentan un valor de p mayor y están formados por blanco, control, y las dosis de 25, 50, 100 y 200 ppm, esto indica que los ratones a los cuales se les administró las dosis de *Hypericum laricifolium* recorrieron una mayor distancia y con mayor velocidad entre los cuatro brazos del laberinto, por lo tanto el extracto no afecta su actividad locomotora y activa su capacidad de exploración.

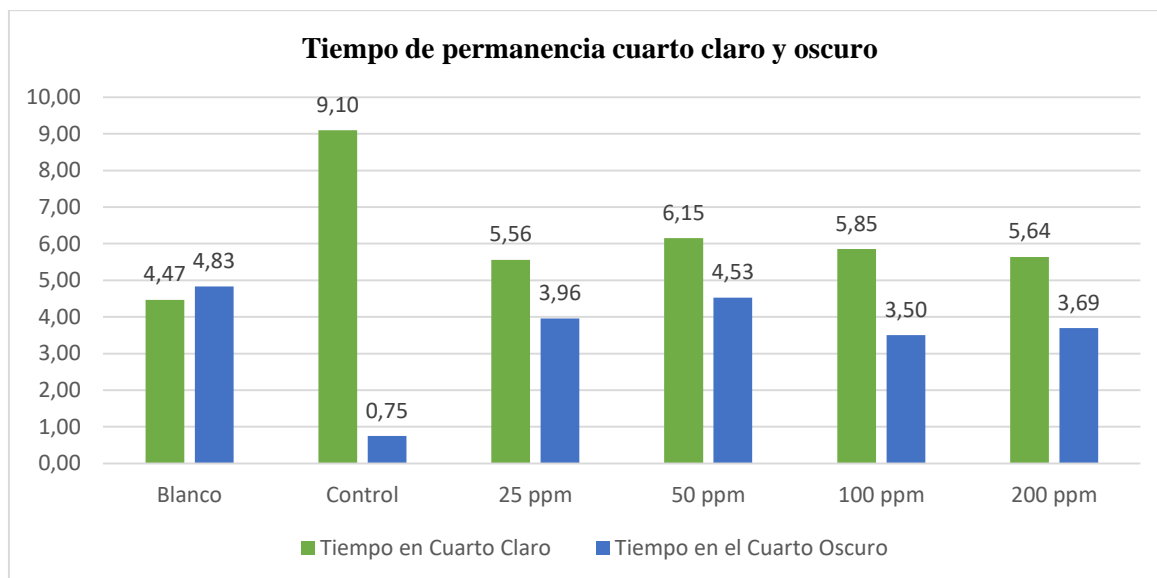
### 3.6.2. *Equipo electrónico Cuarto Claro-Oscuro*

#### 3.6.2.1. *Tiempo en el cuarto claro y cuarto oscuro*

**Tabla. 27-3:** Resultados tiempo cuarto claro y cuarto oscuro

<b>Grupos</b>	<b>Tiempo en Cuarto Claro</b>	<b>Tiempo en el Cuarto Oscuro</b>
Blanco	4,47	4,83
Control	9,10	0,75
25 ppm	5,56	3,96
50 ppm	6,15	4,53
100 ppm	5,85	3,50
200 ppm	5,64	3,69

**Realizado por:** Michele Godoy, 2018



**Gráfico 7-3:** Tiempo de permanencia en el cuarto claro y cuarto oscuro

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.2.2. *Discusión de resultados*

La tabla 27-3 y el gráfico 7-3, representan el tiempo promedio de permanencia en el cuarto claro y oscuro en minutos, observando que el tiempo de permanencia en el cuarto claro es superior en el control con un valor promedio de 9,10 minutos, en cuanto a las cuatro diferentes dosis, sus valores promedios superan con pocos minutos al valor del blanco, el tiempo de permanencia en el cuarto oscuro es mayor e en el blanco.

**Tabla. 28-3:** Resultados del test de ANOVA para tiempo de permanencia en el cuarto claro y oscuro

ANOVA					
Tiempo Cuarto Claro					
	Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	308066,760	5	61613,352	7,585	,000
Dentro de grupos	292439,702	36	8123,325		
Total	600506,462	41			

ANOVA					
Tiempo Cuarto Oscuro					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	239126,088	5	47825,218	6,831	,000
Dentro de grupos	252042,605	36	7001,183		
Total	491168,693	41			

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.2.3. Discusión de resultados

En la tabla 28-3 se muestran los resultados del test de ANOVA para el tiempo de permanencia en el cuarto claro y oscuro en segundos, tanto para el tiempo en el cuarto claro como en el cuarto oscuro, el valor de p es menor al nivel de significancia por lo cual, se tiene la formación de subgrupos por lo cual se aplicó el test de TUKEY.

**Tabla. 29-3:** Resultados del test de TUKEY para el tiempo de permanencia en el cuarto claro y oscuro

Tiempo Cuarto Claro			
HSD Tukey <sup>a</sup>			
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.01	
		1	2
Blanco	7	267,9299	
25ppm	7	333,7522	
200ppm	7	338,2409	
100ppm	7	351,2405	
50ppm	7	368,9925	
Control	7		545,9206
Sig.		,311	1,000

Tiempo Cuarto Oscuro		
HSD Tukey <sup>a</sup>		
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.01

		<b>1</b>	<b>2</b>
Control	7	44,7998	
50ppm	7	198,4341	198,4341
100ppm	7		210,0191
200ppm	7		221,6779
25ppm	7		237,6363
Blanco	7		289,9196
Sig.		,017	,338

**Realizado por:** Michele Godoy, 2018

#### 3.6.2.4. *Discusión de resultados*

La tabla 29-3 presenta los datos obtenidos del test de TUKEY para el tiempo de permanencia en el cuarto claro y oscuro en segundos, en el cual se observa la formación de dos subgrupos, para el tiempo de permanencia en el cuarto claro el subgrupo con mayor valor de p está formado únicamente por el control, en cuanto al tiempo de permanencia en el cuarto oscuro, el subgrupo con mayor valor de p está formado por el blanco, y las dosis 25, 50, 100 y 200 ppm, el subgrupo con menor valor de p está formado por el control y la dosis de 50 ppm.

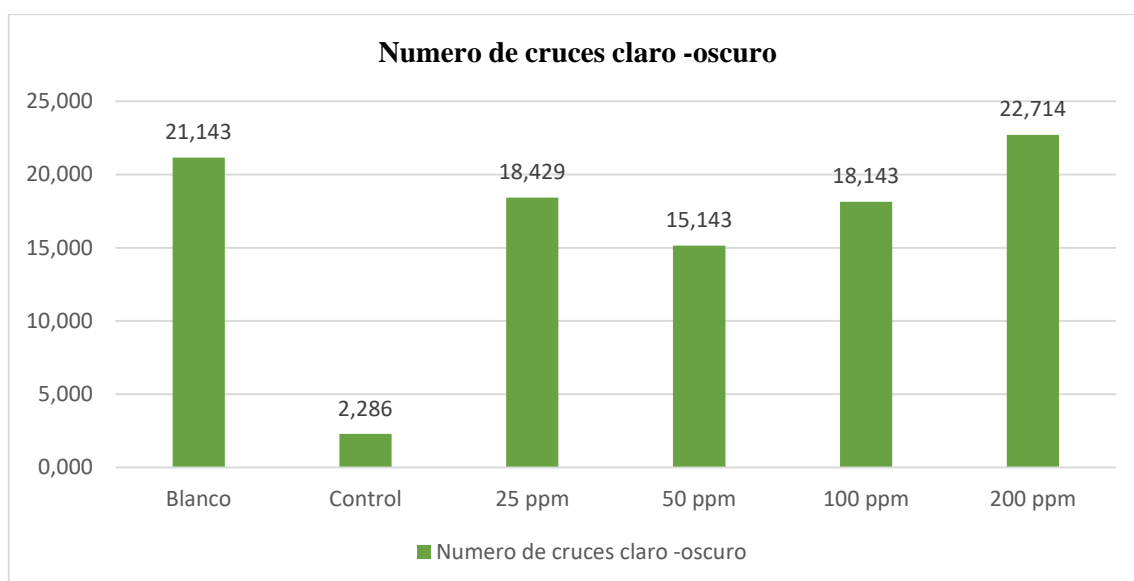
Los resultados obtenidos en el test indican que la actividad ansiolítica del extracto es mínimo, ya que los valores promedios de los tiempos de permanencia en cada cuarto, son estadísticamente similares a los valores del blanco, con excepción de una dosis, esto podría deberse a que el control presenta movilidad limitada, lo cual permanece en lugar en el que se le pone al inicial la prueba, además de que las condiciones del laboratorio no son siempre óptimas, ya que se presenta ruido constante que altera el comportamiento de los ratones.

3.6.2.5. *Número de cruces Claro - Oscuro/ Oscuro – Claro*

**Tabla. 30-3:** Resultados del número de cruces de claro a oscuro y oscuro a claro

Grupos	Numero de cruces claro - oscuro	Numero de cruces oscuro-claro
Blanco	21,143	20,571
Control	2,286	2,286
25 ppm	18,429	18,143
50 ppm	15,143	14,857
100 ppm	18,143	17,571
200 ppm	22,714	22,000

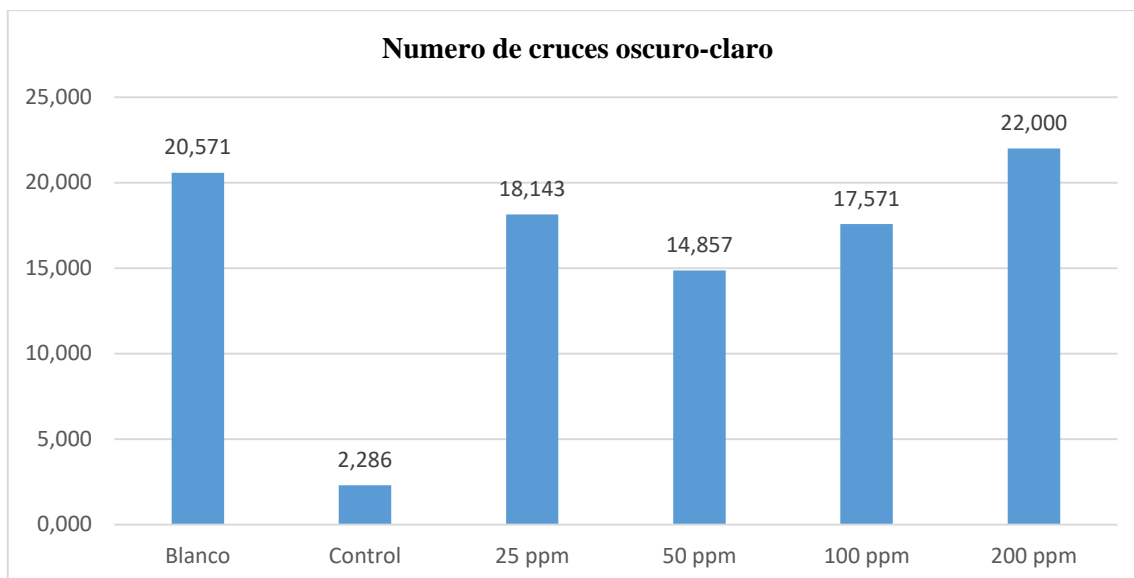
Realizado por: Michele Godoy, 2018



**Gráfico 8-3:** Número de cruces del cuarto claro al oscuro

Realizado por: Michele Godoy, 2018





**Gráfico 9-3:** Número de cruces del cuarto oscuro al claro

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.2.6. *Discusión de resultados*

La tabla 30-3 representa los resultados para el número de entradas en el cuarto claro y cuarto oscuro, y los gráficos 8-3 y 9-3 son una representación de los mismos, en los dos casos tanto el blanco como las cuatro dosis, presentan un mayor número de entradas a los diferentes cuartos, sin embargo, el blanco y la dosis de 25 ppm poseen mayor número de entradas al cuarto oscuro, por otra parte el control tiene mayor número de entradas al cuarto claro, al igual de la dosis de 50, 100 y 200 ppm.

**Tabla. 31-3:** Resultados del Test de ANOVA para el número de cruces claro- oscuro y oscuro- claro.

ANOVA					
Cruces Claro-Oscuro					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1891,833	5	378,367	8,083	,000
Dentro de grupos	1685,143	36	46,810		
Total	3576,976	41			

ANOVA					
Cruces Oscuro-Claro					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1773,048	5	354,610	7,542	,000
Dentro de grupos	1692,571	36	47,016		
Total	3465,619	41			

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.2.7. Discusión de resultados

En la tabla 31-3 se muestran los resultados del test de ANOVA para el número de cruces claro – oscuro y oscuro – claro, en los dos casos el valor de p es menor al nivel de significancia, indicando la formación de subgrupos para lo cual se realizó el test de Tukey.

**Tabla. 32-3:** Resultados del test de TUKEY para el número de entradas claro – oscuro y oscuro – claro

Cruces Claro-Oscuro			
HSD Tukey <sup>a</sup>			
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.01	
		1	2
Control	7	2,2857	
50ppm	7	15,1429	15,1429
100ppm	7		18,1429
25ppm	7		18,4286
Blanco	7		21,1429
200ppm	7		22,7143
Sig.		,014	,325

Cruces Oscuro-Claro			
HSD Tukey <sup>a</sup>			
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.01	
		1	2

Control	7	2,2857	
50ppm	7	14,8571	14,8571
100ppm	7		17,5714
25ppm	7		18,1429
Blanco	7		20,5714
200ppm	7		22,0000
Sig.		,018	,391

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.2.8. *Discusión de resultados*

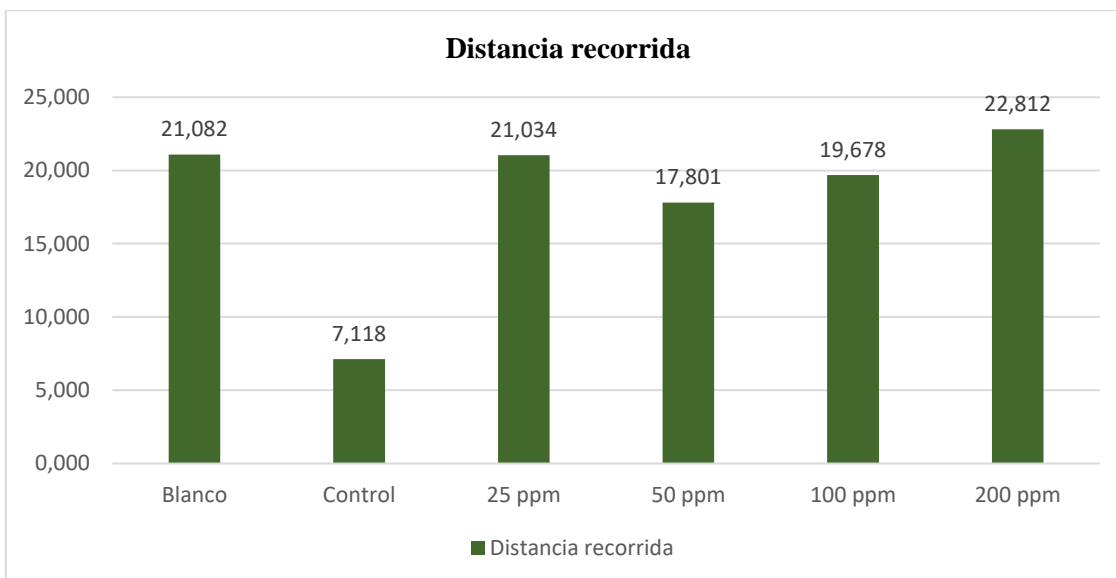
La tabla 32-3 presenta los resultados obtenidos en el test de TUKEY para el número de cruces claro – oscuro y oscuro – claro, se obtuvo la formación de dos subgrupos tanto para entradas en el cuarto claro, como entradas en el cuarto oscuro, los subgrupos con mayor valor de p están formados por el blanco, y las dosis 25, 50, 100 y 200 ppm, esto indica que la actividad locomotora no se ve afectada en los ratones a los cuales se les administró el extracto.

### 3.6.2.9. *Distancia recorrida y Velocidad media en la prueba de cuarto claro – oscuro*

**Tabla. 33-3:** Resultados de la distancia recorrida y velocidad media en la prueba de cuarto claro – oscuro

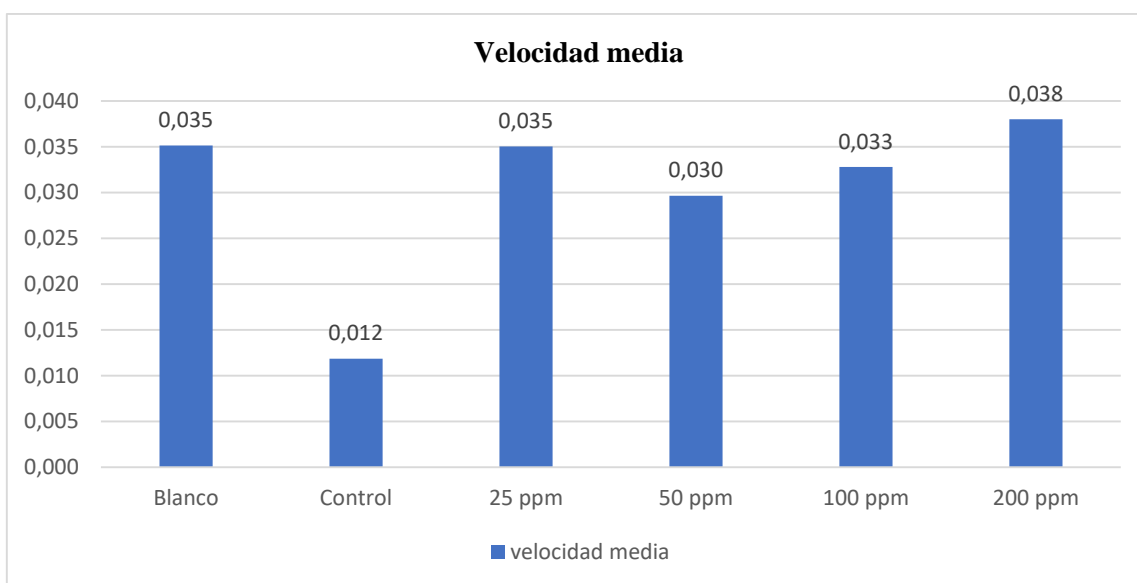
Grupos	Distancia recorrida	Velocidad media
Blanco	21,082	0,035
Control	7,118	0,012
25 ppm	21,034	0,035
50 ppm	17,801	0,030
100 ppm	19,678	0,033
200 ppm	22,812	0,038

Realizado por: Michele Godoy, 2018



**Gráfico 10-3:** Distancia recorrida en la prueba cuarto claro – oscuro

Realizado por: Michele Godoy, 2018



**Gráfico 11-3:** Velocidad media en la prueba de cuarto claro – oscuro

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.2.10. *Discusión de resultados*

La tabla 33-3 y los gráficos 10-3 y 11-3 representan los datos de la distancia recorrida y la velocidad media en la prueba de cuarto claro – oscuro, según los valores obtenidos, el blanco, y las cuatro dosis

presentan una distancia y una velocidad media superior al control, siendo la mayor distancia recorrida de 22,812 m y la velocidad de 0,038 m/s, valores correspondientes a la dosis de 200 ppm.

**Tabla. 34-3:** Resultados del test de ANOVA para la distancia recorrida y velocidad media en el cuarto claro oscuro

ANOVA					
Distancia recorrida					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1139,127	5	227,825	6,083	,000
Dentro de grupos	1348,362	36	37,454		
Total	2487,489	41			

ANOVA					
Velocidad Media					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,003	5	,001	6,083	,000
Dentro de grupos	,004	36	,000		
Total	,007	41			

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.2.11. Discusión de resultados

En la tabla 34-3 se observan los resultados del test de ANOVA para la distancia recorrida y velocidad media para la prueba de cuarto claro oscuro, los datos de las dos pruebas presentan un valor de p menor al nivel de significancia, que es un indicativo de la formación de subgrupos por lo cual se realizó el test de TUKEY.

**Tabla. 35-3:** Resultados del test de TUKEY para la distancia recorrida y velocidad media en el cuarto claro oscuro

<b>Distancia recorrida</b>			
<b>HSD Tukey<sup>a</sup></b>			
<b>Tratamiento</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0.01</b>	
		<b>1</b>	<b>2</b>
Control	7	7,1185	
50ppm	7	17,8006	17,8006
100ppm	7		19,6780
25ppm	7		21,0337
Blanco	7		21,0823
200ppm	7		22,8117
Sig.		,027	,647

<b>Velocidad Media</b>			
<b>HSD Tukey<sup>a</sup></b>			
<b>Tratamiento</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0.01</b>	
		<b>1</b>	<b>2</b>
Control	7	,0119	
50ppm	7	,0297	,0297
100ppm	7		,0328
25ppm	7		,0351
Blanco	7		,0351
200ppm	7		,0380
Sig.		,027	,647

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.2.12. *Discusión de resultados*

En la tabla 35-3 se encuentran los resultados del test de TUKEY para la distancia recorrida y velocidad media obtenidos en la prueba de cuarto claro oscuro, tanto en la distancia recorrida como en la velocidad media se observa la formación de dos subgrupos, el subgrupo con mayor valor de p está formado por el blanco y las cuatro dosis del extracto que fueron administradas, lo cual indica una movilización de los

ratones superior al control, ya que el extracto no afecta la actividad locomotora y capacidad de exploración de los ratones.

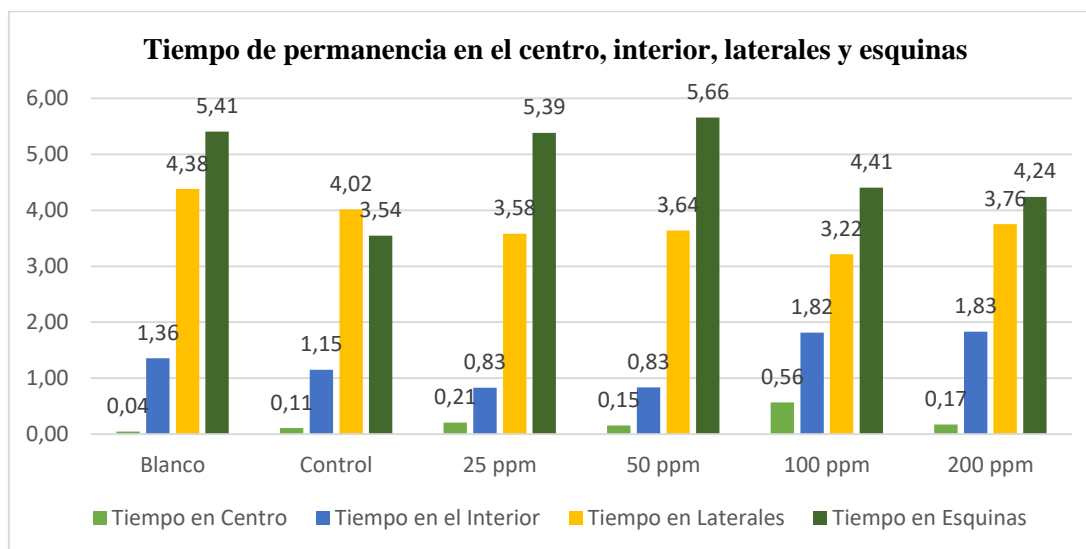
### 3.6.3. Equipo electrónico Campo abierto

#### 3.6.3.1. Tiempo de permanencia en el centro, interior, laterales y esquinas

**Tabla. 36-3:** Datos del tiempo en el centro, interior, laterales y esquinas del equipo campo abierto

Grupos	Tiempo en Centro	Tiempo en el Interior	Tiempo en Laterales	Tiempo en Esquinas
Blanco	0,04	1,36	4,38	5,41
Control	0,11	1,15	4,02	3,54
25 ppm	0,21	0,83	3,58	5,39
50 ppm	0,15	0,83	3,64	5,66
100 ppm	0,56	1,82	3,22	4,41
200 ppm	0,17	1,83	3,76	4,24

Realizado por: Michele Godoy, 2018



**Gráfico 12-3:** Tiempo de permanencia en el centro, interior, laterales y esquinas en la prueba de campo abierto.

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.3.2. Discusión de resultados

La tabla 36-3 y el gráfico 12-3 presentan los datos en minutos del tiempo de permanencia en el centro, interior, laterales y esquinas, en la prueba de campo abierto, se pudo observar que el blanco y las dosis de 25 y 50 ppm permanecen mayor tiempo en las esquinas y laterales que en el centro o el interior, comparándolos con el control y las dosis de 100 y 200 ppm, que permanecen mayor tiempo en el centro y el interior, siendo este un indicativo de la posible efectividad del extracto en cuanto a su actividad ansiolítica.

**Tabla. 37-3:** Resultados del test de ANOVA para tiempo de permanencia en el centro, interior, lateral y esquinas de la prueba campo abierto.

ANOVA					
Tiempo en el centro					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4275,307	5	855,061	4,956	,001
Dentro de grupos	6210,640	36	172,518		
Total	10485,947	41			

ANOVA					
Tiempo en el interior					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	25572,439	5	5114,488	1,515	,009
Dentro de grupos	121506,037	36	3375,168		
Total	147078,476	41			

ANOVA					
Tiempo en las esquinas					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	87919,663	5	17583,933	1,641	,004



Dentro de grupos	385838,140	36	10717,726		
Total	473757,803	41			

ANOVA					
Tiempo en los laterales					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	19981,945	5	3996,389	,437	,000
Dentro de grupos	329352,182	36	9148,672		
Total	349334,127	41			

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.3.3. Discusión de resultados

En la tabla 37-3 se observa los resultados del test de ANOVA para el tiempo de permanencia en segundos, en el centro, interior, laterales y esquinas, en la prueba de campo abierto, todos presentan un valor de p menor al nivel de significancia, lo cual indica la formación de subgrupo, por lo tanto se realizó el test de TUKEY.

**Tabla. 38-3:** Resultados del test de TUKEY para el tiempo de permanencia en el centro, interior, laterales y esquinas, en la prueba de campo abierto

Tiempo en el centro			
HSD Tukey <sup>a</sup>			
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.01	
		1	2
Blanco	7		2,4857
Control	7	6,3578	
50 ppm	7	9,1176	
200 ppm	7	10,2915	
25ppm	7	12,4100	
100 ppm	7	33,8648	
Sig.		,719	,004

<b>Tiempo en el interior</b>			
<b>HSD Tukey<sup>a</sup></b>			
<b>Tratamiento</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0.01</b>	
		<b>1</b>	<b>2</b>
25ppm	7	49,6146	49,6146
50 ppm	7	50,0589	50,0589
Control	7	68,9092	
Blanco	7	81,3685	81,3685
100 ppm	7	108,9222	
200 ppm	7	109,8856	
Sig.		,395	,005

<b>Tiempo en las esquinas</b>			
<b>HSD Tukey<sup>a</sup></b>			
<b>Tratamiento</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0.01</b>	
		<b>1</b>	<b>2</b>
Control	7	212,6571	
200 ppm	7	254,4892	
100 ppm	7	264,4878	
25ppm	7		323,2135
Blanco	7		324,3603
50 ppm	7	339,5723	339,5723
Sig.		,023	,223

<b>Tiempo en los laterales</b>			
<b>HSD Tukey<sup>a</sup></b>			
<b>Tratamiento</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0.01</b>	
		<b>1</b>	<b>2</b>
100 ppm	7	193,0252	193,0252
25ppm	7	241,0351	
50 ppm	7	225,3338	225,3338
200 ppm	7	218,3711	218,3711
Control	7		214,7619

Blanco	7	262,8281	
Sig.		,747	,047

Realizado por: Michele Godoy, 2018

#### 3.6.3.4. *Discusión de resultados*

La tabla 40-3 presenta los resultados del test de TUKEY para el tiempo de permanencia en el centro, interior, esquinas y laterales, en la prueba de campo abierto, obteniendo la formación de dos subgrupos homogéneos. El subgrupo con mayor valor de p para el tiempo de permanencia en el centro está formado por, el control y las cuatro diferentes dosis.

En cuanto al tiempo de permanencia en el interior el subgrupo con mayor valor de p está formado por blanco, control, y las cuatro diferentes dosis, lo cual indica que estadísticamente los valores son similares, el subgrupo con mayor valor de p en el tiempo de permanencia en las esquinas está formado por el blanco, y las dosis 25 y 50 ppm, al igual que en el tiempo de permanencia en los laterales el subgrupo está formado por el blanco, y las dosis 25, 50 ppm.

Según los resultados obtenidos, el extracto de *Hypericum laricifolium*, presentaría actividad ansiolítica, destacando principalmente las dosis de 100 y 200 ppm por presentar un valores y características estadísticamente similares al control en el tiempo de permanencia en el centro e interior, mientras que las dosis 25 y 50 ppm presentan valores estadísticamente similares al blanco, en el tiempo de permanencia en las esquinas y laterales.

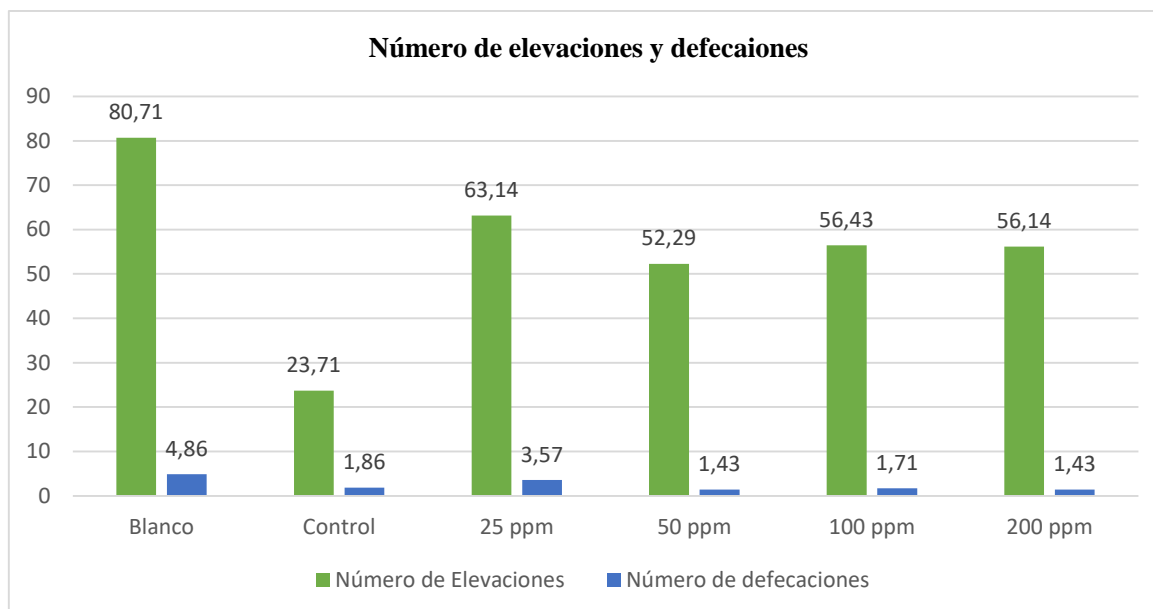
#### 3.6.3.5. *Número de elevaciones y defecaciones*

**Tabla. 39-3:** Resultados del número de elevaciones y defecaciones en la prueba de campo abierto

Grupos	Número de Elevaciones	Número de defecaciones
Blanco	80,71	4,86
Control	23,71	1,86

25 ppm	63,14	3,57
50 ppm	52,29	1,43
100 ppm	56,43	1,71
200 ppm	56,14	1,43

Realizado por: Michele Godoy, 2018



**Gráfico 13-3:** Número de elevaciones y defecaciones en la prueba campo abierto

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.3.6. *Discusión de resultados*

En la tabla 39-3 y el gráfico 13-3, están representados los resultados sobre el número de elevaciones y defecaciones obtenidos en la prueba de campo abierto, obteniendo que el número de elevaciones, son relativamente similares, entre el blanco y la dosis de 25 ppm y el control con las dosis 50, 100 y 200.

En cuanto al número de defecaciones, el blanco y la dosis de 25 ppm presentan mayor número de defecaciones, por el contrario el control, y las dosis de 50, 100 y 200 ppm presentan un número menor de defecaciones, estos datos nos permiten determinar la actividad ansiolítica del extracto.

**Tabla. 40-3:** Resultados del test de ANOVA para el número de elevaciones y defecaciones en la prueba de campo abierto

ANOVA					
Número de elevaciones					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	12012,405	5	2402,481	2,865	,000
Dentro de grupos	30187,714	36	838,548		
Total	42200,119	41			

ANOVA					
Número de defecaciones					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	70,190	5	14,038	2,968	,000
Dentro de grupos	170,286	36	4,730		
Total	240,476	41			

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.3.7. *Discusión de resultados*

En la tabla 40-3 se puede observar los resultados del test de ANOVA para el número de elevaciones y el número de defecaciones obtenidos en la prueba de campo abierto, el valor de p para los dos parámetros es menor al nivel de significancia, indicando la formación de subgrupos homogéneos, por lo cual se realizó el test de TUKEY.

**Tabla. 41-3:** Resultados del test de TUKEY para el número de elevaciones y defecaciones para la prueba en campo abierto

Número de elevaciones			
HSD Tukey <sup>a</sup>			
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.01	
		1	2
Control	7	23,7143	

25ppm	7		63,1429
200 ppm	7	56,1429	56,1429
100 ppm	7	56,4286	56,4286
Blanco	7		80,7143
50 ppm	7	52,2857	52,2857
Sig.		,137	,456

<b>Número de defecaciones</b>			
<b>HSD Tukey<sup>a</sup></b>			
<b>Tratamiento</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto para alfa = 0.01</b>	
		<b>1</b>	<b>2</b>
50 ppm	7	1,4286	1,4286
200 ppm	7	1,4286	1,4286
100 ppm	7	1,7143	1,7143
Control	7		1,8571
25ppm	7	3,5714	
Blanco	7	4,8571	
Sig.		,057	,025

**Realizado por:** Michele Godoy, 2018.

### 3.6.3.8. *Discusión de resultados*

En la tabla 41-3 se puede observar los resultados obtenidos en el test de TUKEY para el número de elevaciones y defecaciones en la prueba de campo abierto, obteniendo la formación de dos subgrupos, en el número de elevaciones el subgrupo con mayor valor de p, está formado por el blanco, y las dosis 25, 50, 100 y 200 ppm, de igual forma para el número de defecaciones.

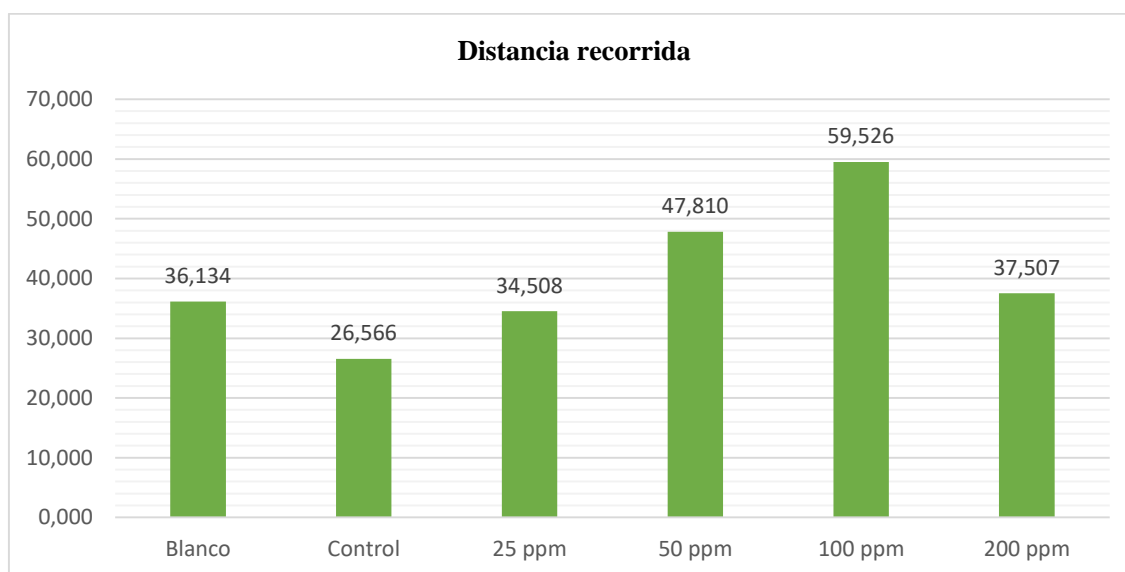
Sin embargo, los sub grupos con menor valor de p tanto para número de defecaciones y elevaciones están formados por el control y las dosis 50, 100 y 200 ppm, lo cual indica que estos datos son estadísticamente similares, por lo tanto el extracto de *Hypericum laricifolium* presenta actividad ansiolítica.

3.6.3.9. *Distancia recorrida y Velocidad media en la prueba de campo abierto*

**Tabla. 42-3:** Resultados de la distancia recorrida y velocidad media en la prueba de campo abierto

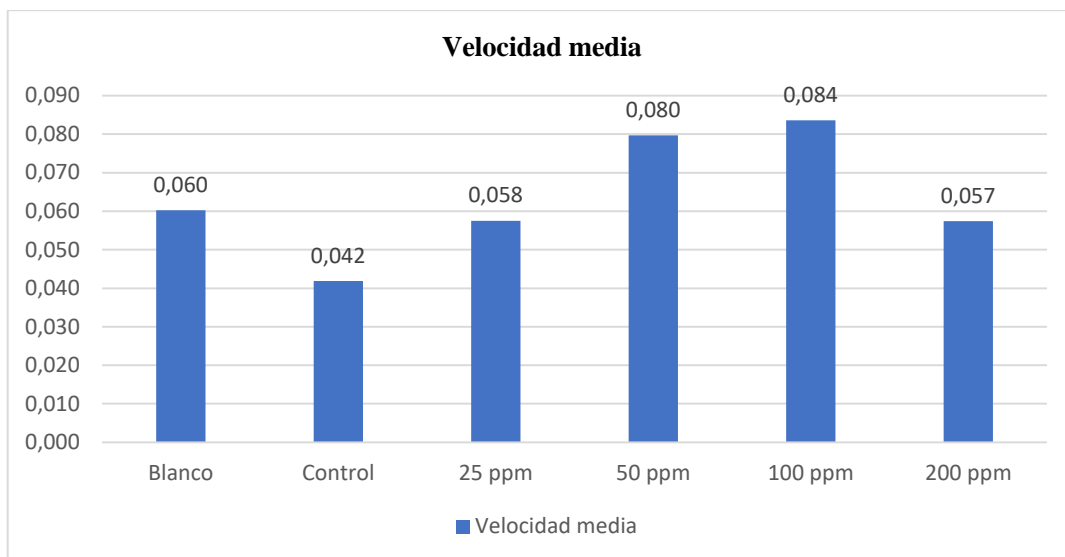
Grupos	Distancia recorrida	Velocidad media
Blanco	36,134	0,060
Control	26,566	0,042
25 ppm	34,508	0,058
50 ppm	47,810	0,080
100 ppm	59,526	0,084
200 ppm	37,507	0,057

Realizado por: Michele Godoy, 2018



**Gráfico 14-3:** Distancia recorrida en la prueba de campo abierto

Realizado por: Michele Godoy, 2018



**Gráfico 15-3:** Velocidad media en la prueba de campo abierto

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.3.10. Discusión de resultados

La tabla 42-3 y los gráficos 14-3 y 15-3, presentan los resultados de la distancia recorrida y velocidad media, en la prueba de campo abierto, obteniendo que el blanco y las dosis 25, 50, 100 y 200 ppm presentan mayor distancia recorrida y mayor velocidad media que el control, datos indicativos de la actividad locomotora de los roedores.

**Tabla. 43-3:** Resultados del test de ANOVA para la distancia recorrida y velocidad media en la prueba de campo abierto

ANOVA					
Distancia Recorrida					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4713,385	5	942,677	3,135	,001
Dentro de grupos	10826,694	36	300,742		
Total	15540,079	41			

ANOVA					
Velocidad Media					



	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,009	5	,002	1,283	,001
Dentro de grupos	,048	36	,001		
Total	,056	41			

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.3.11. Discusión de resultados

En la tabla 43-3 se observan los resultados del test de ANOVA para la distancia recorrida y velocidad media en la prueba de campo abierto, el valor de p para los dos parámetros es igual al nivel de significancia, existiendo la formación de subgrupos, por lo cual se realizó el test de TUKEY.

**Tabla. 44-3:** Resultados del test de TUKEY para la distancia recorrida y velocidad media en la prueba de campo abierto

Distancia Recorrida			
HSD Tukey <sup>a</sup>			
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.01	
		1	2
Control	7		26,5664
25ppm	7	34,5079	
Blanco	7	36,1348	
200 ppm	7	37,5069	
50 ppm	7	47,8099	
100 ppm	7	59,5261	
Sig.		,013	,004

Velocidad Media			
HSD Tukey <sup>a</sup>			
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.01	
		1	2
Control	7		,0419

200 ppm	7	,0574	
25ppm	7	,0575	
Blanco	7	,0601	
50 ppm	7	,0797	
100 ppm	7	,0836	
Sig.		,290	,004

Realizado por: Michele Godoy, 2018

### 3.6.3.12. *Discusión de resultados*

La tabla 44-3 representa los resultados obtenidos en el test de TUKEY para la distancia recorrida y velocidad media en la prueba de campo abierto, en los dos parámetros se han formado dos subgrupos, el subgrupo con mayor valor de p en ambos casos está formado por, el blanco, y las dosis 25, 50, 100 y 200 ppm, lo cual indica una buena actividad locomotora pese a la administración del extracto.

### 3.6.3.13. *Discusión general de los resultados de actividad ansiolítica*

**Tabla. 45-3:** Resumen estadístico de los grupos formados por el control y las diferentes dosis, en lo parámetros relevantes para determinar la actividad ansiolítica y sedante

<b>Laberinto en cruz Elevado</b>			
<b>Brazos abiertos</b>	CO, D1, D2, D4, D3	<b>Brazos cerrados</b>	CO, D1, D4, D2, D3
<b>Cuarto Claro – Oscuro</b>			
<b>Cuarto claro</b>	CO	<b>Cuarto oscuro</b>	CO, D3
<b>Campo Abierto</b>			
<b>Centro</b>	CO, D1, D2, D3, D4	<b>Interior</b>	CO, D1, D2, D3, D4
<b>Esquinas</b>	CO, D2, D3,D4	<b>Laterales</b>	CO, D2,D3,D4

<b>Elevaciones</b>	CO, D2,D3,D4	<b>Defecaciones</b>	CO,D2,D3,D4
--------------------	--------------	---------------------	-------------

Realizado por: Michele Godoy, 2018

**Tabla. 46-3:** Resumen estadístico de los grupos formado por el control y las diferentes dosis en los parámetros para evaluar actividad locomotora

	<b>Laberinto en cruz elevado</b>	<b>Cuarto Claro - Oscuro</b>	<b>Campo Abierto</b>
<b>Distancia recorrida</b>	CO, D1, D3, D4	CO, D2,	CO
<b>Velocidad media</b>	CO,D1,D3,D4	CO, D2	CO
<b>Cruces</b>	-	CO, D2	-
<b>Ent. Brazos abiertos</b>	CO, D1, D2, D3,D4	-	-
<b>Ent. Brazos cerrados</b>	CO, D1,D2,D3,D4	-	-

Realizado por: Michele Godoy, 2018

Las tablas 45-3 y 46-3 son un resumen estadístico de los parámetros más importantes para determinar la actividad ansiolítica, sedante, y locomoción, tres de las cuatro dosis evaluadas presentan un comportamiento ansiolítico, ya que al ser comparadas con el control positivo (Clonazepam), muestran resultados estadísticamente semejantes, de igual forma, las dosis presentan buena actividad locomotora.

Los resultados en el equipo electrónico cuarto claro-oscuro, dio resultados negativos en cuanto a la determinación de actividad ansiolítica, ya que al comparar los datos con el control positivo, estos no fueron estadísticamente similares, no obstante al comparar los datos individualmente, los ratones a los cuales se les administró el extracto permanecían mayor tiempo en el cuarto claro. Esto posiblemente puede deberse a la movilidad limitada que presenta el control, y por lo cual permanece mayor tiempo en un mismo lugar, además diferentes influencias externas que alteran significativamente el comportamiento de los ratones, por ejemplo el ruido constante que se presenta dentro y fuera del laboratorio.

Dosis 1 (25 mg de extracto de *Hypericum laricifolium*/ kg)

Para determinar la actividad ansiolítica se analizó los tiempos de permanencia en el cuarto claro del equipo CCO, en los brazos abiertos del LCE y tiempos de permanencia en el centro e interior, en el equipo CA, obteniendo como resultado que esta dosis mostró valores estadísticamente similares a los expuestos por el control. Lo cual indica cierta actividad ansiolítica, mientras que el tiempo de permanencia en las esquinas y laterales, al igual que el número de elevaciones y defecaciones difieren del control, lo cual indica una disminución de actividad sedante.

Para evaluar la actividad locomotora se evalúa la distancia recorrida, velocidad media, número de cruces y entradas a los brazos, los valores obtenidos de esta dosis en los tres equipos son diferentes al control por lo tanto la actividad locomotora no se ve afectada.

Dosis 2 (50 mg de extracto de *Hypericum laricifolium*/ kg)

Al evaluar los tiempos de permanencia en los brazos abiertos y en el cuarto oscuro de los equipos LCE y CCO, esta dosis presenta valores estadísticamente similares al control, indicando que presenta actividad ansiolítica. El tiempo de permanencia en el centro, interior, esquinas y laterales del equipo CA fueron similar al tiempo expuesto por el control, al igual que el número de elevaciones y defecaciones, lo cual indica que esta dosis presenta actividad ansiolítica y sedante.

Por otra parte la dosis 2 en los parámetros de distancia recorrida y velocidad media del equipo LCE y CCO, así como número de cruces y entradas a los brazos abiertos en los dos equipos, presentó valores similares al control, mientras que, en el equipo CA en estos dos parámetros, mostraron valores diferentes a los del control, lo que hace que, la actividad locomotora se ve afectada, pero en menor intensidad.

Dosis 3 (100 mg de extracto de *Hypericum laricifolium*/ kg)

Esta dosis, presenta una buena actividad ansiolítica y sedante, ya que, al analizar los tiempos de permanencia en los, brazos abiertos, tiempo en el centro, interior, esquinas y laterales, así como el número de elevaciones y defecaciones de los tres equipos, los valores de esta dosis fueron estadísticamente similares a los valores del control positivo (Clonazepam).

Se presentó además que la actividad locomotora no fue afectada, debido a que los parámetros de distancia recorrida, velocidad media del equipo CCO y CA, así como el número de cruces en el campo abierto, tienen valores diferentes al control.

Dosis 4 (200 mg de extracto de *Hypericum laricifolium*/ kg)

La actividad ansiolítica en esta dosis es buena, ya que, al analizar los tiempos de permanencia, en los brazos abiertos del equipo LCE, en el centro, interior, esquinas y laterales del equipo CA, se mostraron valores estadísticamente similares a los expuestos por el control. De igual forma presenta actividad sedante ya que el número de elevaciones y defecaciones en el equipo CA, son estadísticamente similares con el control.

La actividad locomotora no fue afectada, debido a que, los parámetros de distancia recorrida, velocidad media, y número de cruces en los equipos CCO y CA, presentan valores diferentes al control, confirmando que presenta actividad locomotora.

## CONCLUSIONES

Los ensayos del control de calidad de la droga cruda y del extracto hidroalcohólico de las flores de *Hypericum laricifolium*, cumplieron con todos los rangos establecidos en la USP 35, haciéndola apta para realizar los ensayos posteriores.

Se identificó cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en la planta, obteniendo metabolitos como: aceites esenciales, grasas, triterpenos, esteroides, flavonoides, fenoles, catequinas, lactonas, cumarinas y principios amargos.

Se determinó la cantidad de flavonoides y fenoles totales presentes en el extracto de *Hypericum laricifolium*, los valores fueron de 14,61 mg Equivalentes de Quercetina/g de extracto liofilizado de flavonoides totales y 14,48 mg Equivalentes de ácido Gálico/g de extracto liofilizado de fenoles totales.

Se evaluó la actividad ansiolítica del extracto de las flores de *Hypericum laricifolium* a diferentes concentraciones, comprobando que presenta actividad ansiolítica según los resultados obtenidos, mediante análisis estadísticos y comprobando los mismos con el control positivo (clonazepam), lo cual podría deberse a metabolitos como flavonoides, terpenos y alcaloides, además datos como la distancia recorrida y velocidad media son un indicio de la buena actividad locomotora presente en los ratones a los cuales se les administró el extracto.

La dosis con resultados destacados fueron las de 100 mg/kg y 200 mg/ kg, ya que presentan buena actividad ansiolítica y sedante al formar parte de todos los grupos con el control, en todos los parámetros de los equipos utilizados. El movimiento del ratón no se vio afectado significativamente. Por lo tanto se considera que estas dosis tienen un efecto ansiolítico bueno sin afectar la actividad locomotora en los biomodelos. Considerándose una ventaja frente a los fármacos tradicionales.

Se disminuyó la dosis diaria del control positivo (clonazepam) significativamente, ya que según datos anteriores de tesis previas, se observó que la dosis de 50 mL afecta significativamente la locomoción de los ratones, hasta el punto de no realizar ningún tipo de movimiento, además de producir taquicardia a

los mismos, por el contrario la dosis de 25 mL no afecta mayormente la locomoción, sin embargo presentan cierta depreciación en el movimiento pero no causa taquicardia.

Los equipos que proporcionan mayor información sobre la determinación de la ansiedad, son el laberinto en cruz elevado y el modelo de campo abierto ya que en estos equipos podemos encontrar datos relevantes que sugieren ansiedad o relajación de los biomodelos.

## RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar nuevamente el tamizaje fitoquímico de la planta, recolectándola de otro lugar y en diferente época del año, ya que es una planta con pocos estudios ansiolíticos.

Se recomienda realizar una evaluación de toxicidad de *Hypericum laricifolium*, para obtener información de los posibles riesgos que puede ocasionar la administración constante de esta planta, y en las dosis de 100 y 200 ppm.

Al momento de realizar los ensayos de ansiedad en los diferentes equipos, se recomienda tomar en cuenta la luz del cuarto, así como la posición de los equipos, estos deben estar rectos para facilitar su procesamiento en las diferentes aplicaciones.

Se recomienda utilizar una cámara de mejor resolución ya que la cámara que se usa actualmente, no capta al ratón en las partes más oscuras de los equipos laberinto en cruz elevado y cuarto claro-oscuro, lo cual puede ser un problema al momento de obtener los datos de movimiento en estos equipos.

Al procesar los videos se debe tener en cuenta que el valor del umbral puede variar considerablemente dependiendo de la luz al momento de grabar los videos.

Se recomienda evaluar diferentes actividades farmacológicas en esta planta, ya que posee diversos metabolitos con diversidad de actividades farmacológicas de gran importancia.



## BIBLIOGRAFÍA

**BBC News Mundo.** Noticias BBC. [En línea] 2018. [Citado el: 08 de 09 de 2018.] Disponible en :  
<https://www.bbc.com/mundo/noticias-45330141>.

**Benavides, Guénet.** Sistemática de los roedores utilizados en el laboratorio. Man genética roedores Lab Principios básicos y Apl. [En línea] 2003. [Citado el: 03 de 07 de 2018.]. Disponible en :  
<http://secal.es/wp-content/uploads/2014/10/03-GENETICA-Pba-2.pdf.pdf>.

**Borras Blasco, J. Navarro Ruiz, A, Gonzalez Delgado, M.** Hierba de San Juan (*Hypericum Perforatum* sp). [En línea] 2001. [Citado el: 18 de 06 de 2018.]. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-farmacologia-hospitalaria-121-articulo-hierba-san-juan-hypericum-perforatum-13119161>.

**Cárdenas, Navarro.** *Modelos animales de ansiedad incondicionada*. Elsevier, 2002 Vol. I, págs. 20-25.

**Cea, R.** *Fitofármacos, metabolitos secundarios* . DICA Inventar; San Salvador, El Salvador, 2013 Vol. I, págs. 15-25.

**Celis, C. Marinez, D. Conde, A.** Modelos animales. [En línea] 2010. [Citado el: 08 de 08 de 2018.]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=343835700005> .

**Chan, M.** La atención primaria de salud, más necesaria que nunca. Revista Cuba Salud Publica. [En línea] 2009. [Citado el: 18 de 06 de 2018.]. Disponible en:  
[http://www.who.int/whr/2008/08\\_report\\_es.pdf](http://www.who.int/whr/2008/08_report_es.pdf) .

**Drac, Barreto M, Ingelmo CJ, Puppo s.** Farmacología de benzodiazepinas, hipnóticos y ansiolíticos no benzodiazepínicos, psicoestimulantes, etanol y neuroactivadores cognitivos. Teórico BZD [En línea]. (2003); pp: 1–27. [Consulta: 23 julio 2016]. Disponible en:

<https://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/04/farmacologiade-las-benzodiazepinas-ansioliticos-hipnoticos-no-benzodiazepinicos-psicoestimulantes-y-neuroactivadores-cognitivos.pdf>

**El Comercio.** En la actualidad, los jóvenes experimentan cada vez más ansiedad. [En línea] 2014. [Citado el: 18 de 06 de 2018.]. Disponible en: <http://www.elcomercio.com.ec/tendencias/actualidad-jovenes-experimentan-mas-ansiedad.html>

**Escamilla.** *Trastornos de ansiedad. Trastorno de ansiedad generalizado. Trastorno de pánico.*, Medicine, 2011 Vol. 10, págs. 5725-5733.

**Ferre, F., & Camarillo, L.** *Estado actual de tratamiento de la ansiedad.* Medicine, 2013 Vol. 11, págs. 1-25.

**Festorazzi, A., Rodríguez, L., & Lotero, J.** *Epidemiología de los trastornos de ansiedad y depresión en adolescentes de una población rural.* Medicine, 2008 Vol. 2, págs. 5-8.

**Flores .** *Farmacología Humana.* Elsevier, 2014 Vol. 1, págs. 543-565.

**Geréz, Gullace.** Reproducción en animales de laboratorio 1 ° parte : RATA - RATÓN. Técnicas para Bioterio IV. [En línea] 2011. [Citado el: 03 de 07 de 2018.] Disponible en: <http://dpd.fvet.uba.ar/cartelera/00010199.pdf> .

**Gilman & Goodman.** *Tratamiento farmacológico de la depresión y los trastornos de ansiedad.* 1ra Edición. Mexico 2011 : McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A.

**Gonzales.** Transtornos de ansiedad. [En línea] 2014. [Citado el: 25 de 06 de 2018.] Disponible en: [rtasingularidad.com/events/libro\\_trastorno\\_de\\_ansiedad.pdf](http://rtasingularidad.com/events/libro_trastorno_de_ansiedad.pdf) .

**Guía de Práctica Clínica.** *Guía de Práctica Clínica para el Manejo de Pacientes con Trastorno de Ansiedad.* 2da Edición. Madrid- España 2008 : Agencia Laín Entralgo. Unidad de Evaluación de Tecnologías Sanitarias,.

**Instituto Nacional Mental.** Transtornos de Ansiedad. Revista Inst Nac la Salud Mental. [En línea] 2009. [Citado el: 21 de 06 de 2018.] Disponible en: <http://www.nimh.nih.gov>.

**Kuklinski.** *Farmacognosia y Productos naturales.* 1ra. Barcelona-España 2009 : Ediciones Omega S.A

**Lopez, M.** ABC.[En línea] 2018. [Citado el: 07 de 09 de 2018.] Disponible en:[https://www.abc.es/salud/enfermedades/abci-identificadas-neuronas-responsables-ansiedad-201802021546\\_noticia.html](https://www.abc.es/salud/enfermedades/abci-identificadas-neuronas-responsables-ansiedad-201802021546_noticia.html).

**Marsiglia.** *Estudio clínico y epidemiológico de la ansiedad y la depresión .* 1, 2010, Gac Méd, 2010 Vol. 118, págs. 10-12.

**Navarro, Moreira.** Estado actual del tratamiento de la ansiedad. [En línea] 2013. [Citado el: 2018 de 06 de 25.] Diponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304541213706930?via%3Dihub>.

**Palomino, Lady,** *Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia Colombia.* VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 2009 Vol. 16, 2009 págs. 1-8.

**Pastrana Jiménez JI** Guía de ayuda a pacientes y familiares: Trastornos de ansiedad y estrés. Fund Juan José López-Ibor Fund Arpegio. [En línea] 2007. [Citado el: 18 de 06 de 2018.] 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) .

**Peiro, Gálves, Lucas.** Monográfico de Hypericum L. [En línea] 2010. [Citado el: 18 de 06 de 2018.] Disponible en: [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Dialnet-MonograficoDeHypericumPerforatumL-3261139%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Dialnet-MonograficoDeHypericumPerforatumL-3261139%20(1).pdf).

**Pelissolo A.** Trastornos de ansiedad y neuróticos EMC-Tratado Med. [En línea] 2012. [Citado el: 21 de 06 de 2018.] Disponible en:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1636541012633972>.

**Polanco, Vargas.** Pruebas utilizadas en ansiedad. [En línea] 2012. [Citado el: 03 de 07 de 2018.] Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/sumps/v18n2/v18n2a11.pdf>.

**Puchol, Esparza.** Los trastornos de ansiedad: la epidemia silenciosa del siglo XXI. Revista Psicología Científica.com. Valencia. [En línea] 2003. [Citado el: 18 de 06 de 2018.] Disponible en: <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesiseortiz/2016/05/22/Lopez-Gilda.pdf>.

**Rejón, Perdomo.** Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas. Research Gate. [En línea] 2010. [Citado el: 18 de 06 de 2018.] Disponible en: <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/vnimedica/article/view/16039>.

**Rejón.O, Perdomo,R.** Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas. Research Gate. [En línea] 2011. [Citado el: 08 de 08 de 2018.] Disponible en: <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/vnimedica/article/view/16039>.

**Reyes, Ticas.** Trastornos De Ansiedad Guia Practica Para Diagnostico Y Tratamiento. [En línea] 2005. [Citado el: 18 de 06 de 2018.] Disponible en:

<http://www.bvs.hn/Honduras/pdf/TrastornoAnsiedad.pdf>.

**Rushdey, Therese.** Constituents of Hypericum laricifolium and Their Cyclooxygenase (COX). [En línea] 2003. [Citado el: 20 de 06 de 2018.] Disponible en:

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/51/12/51\\_12\\_1439/\\_pdf/-char/en](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/51/12/51_12_1439/_pdf/-char/en).

**Saenz, Campos.** *Medicamentos, plantas medicinales y productos naturales.*, Dpto.Farmacoterapia CCSS, 2004 Vol. 16, pág. 20.

**Schalatter, Garrán.** Trastornos de ansiedad (II). Fobias. Trastorno obsesivo-compulsivo. [En línea] 2011. [Citado el: 21 de 06 de 2018.] Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412\(11\)70168-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412(11)70168-8).

**Sharapin.** *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. 1ra. Bogotá-Colombia 2000 : Quebecor.

**Sierra, Ortega.** Ansiedad, Angustia y Estrés: Tres Conceptos a diferenciar. [En línea] 2003. [Citado el: 21 de 06 de 2018.] Disponible en: <http://pepsic.bvsalud.org/pdf/malestar/v3n1/02.pdf>.

**Sollozo, Camarena. López C.** Medicina tradicional : estudios preclínicos de plantas con propiedades ansiolíticas. [En línea] 2011. [Citado el: 18 de 06 de 2018.] Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/residente/rr-2011/rr112c.pdf>.

**Vega, Zambrano.** CI USO, Administraci PDE. Clonazepam Pademecum. [En línea] 2010. [Citado el: 2 de 07 de 2018.] Disponible en: <http://www.hipocampo.org/clonazepam.asp>.

**Vogel, H. D** *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*. Pharmacological Assays. New York, 2008 Vol. II, págs. 51-60.

**Zahumenszky, C.** GIZMODO. [En línea] 2018. [Citado el: 08 de 09 de 2018.] Disponible en: <https://es.gizmodo.com/identifican-un-nuevo-tipo-de-neurona-exclusiva-del-cere-1828647000>.

## **ANEXOS**

**Anexo. A:** Flor de *Hypericum laricifolium*



**Realizado por:** Michele Godoy, 2018

**Anexo. B:** Recolección de la planta



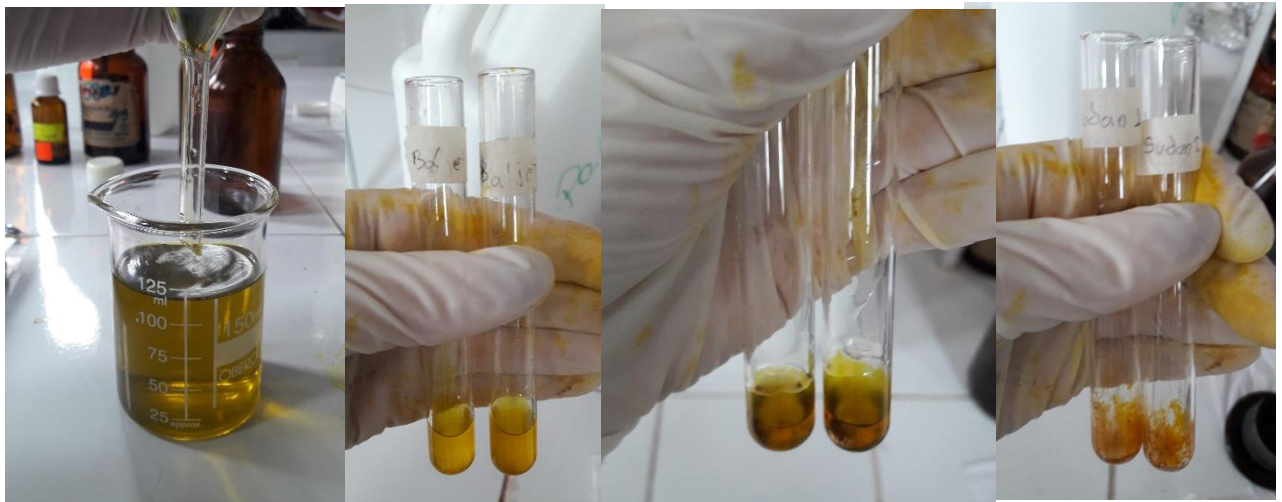
**Realizado por:** Michele Godoy, 2018

**Anexo. C:** Control de calidad de la planta



Realizado por: Michele Godoy, 2018

**Anexo. D:** Ensayo fitoquímico en el extracto etéreo de *Hypericum laricifolium*



Realizado por: Michele Godoy, 2018

**Anexo. E:** Ensayo fitoquímico en el extracto alcohólico de *Hypericum laricifolium*





Realizado por: Michele Godoy, 2018

**Anexo. F:** Ensayo fitoquímico en el extracto acuoso de *Hypericum laricifolium*





Realizado por: Michele Godoy, 2018

**Anexo. G:** Filtración y concentración del extracto hidroalcoholico de *Hypericum laricifolium*



Realizado por: Michele Godoy, 2018

**Anexo. H:** Liofilización extracto hidroalcoholico de *Hypericum laricifolium*



Realizado por: Michele Godoy, 2018



### Anexo. I: Cuantificación de flavonoides y fenoles totales



Realizado por: Michele Godoy, 2018

### Anexo. J: Administración del extracto de *Hypericum laricifolium* a ratones *Mus musculus*



**Realizado por:** Michele Godoy, 2018

**Anexo. K:** Equipo Laberinto en Cruz Elevado

**Anexo. L:** Equipo Cuarto Claro – Oscuro



**Realizado por:** Michele Godoy, 2018

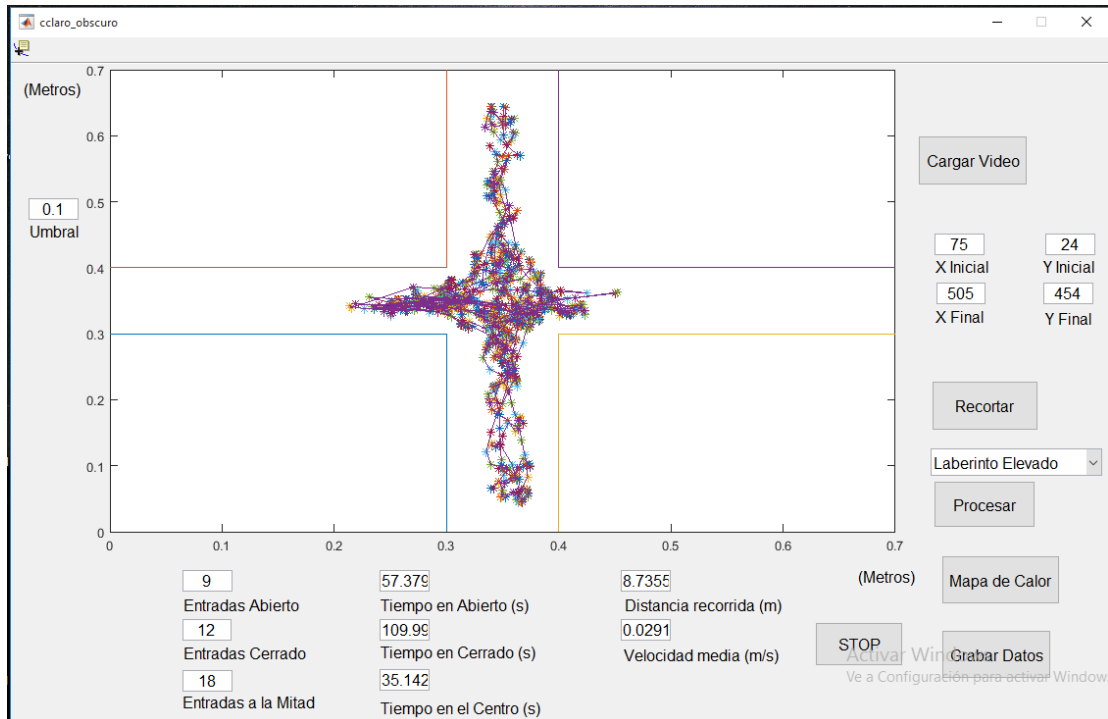
**Anexo. M:** Equipo Campo Abierto





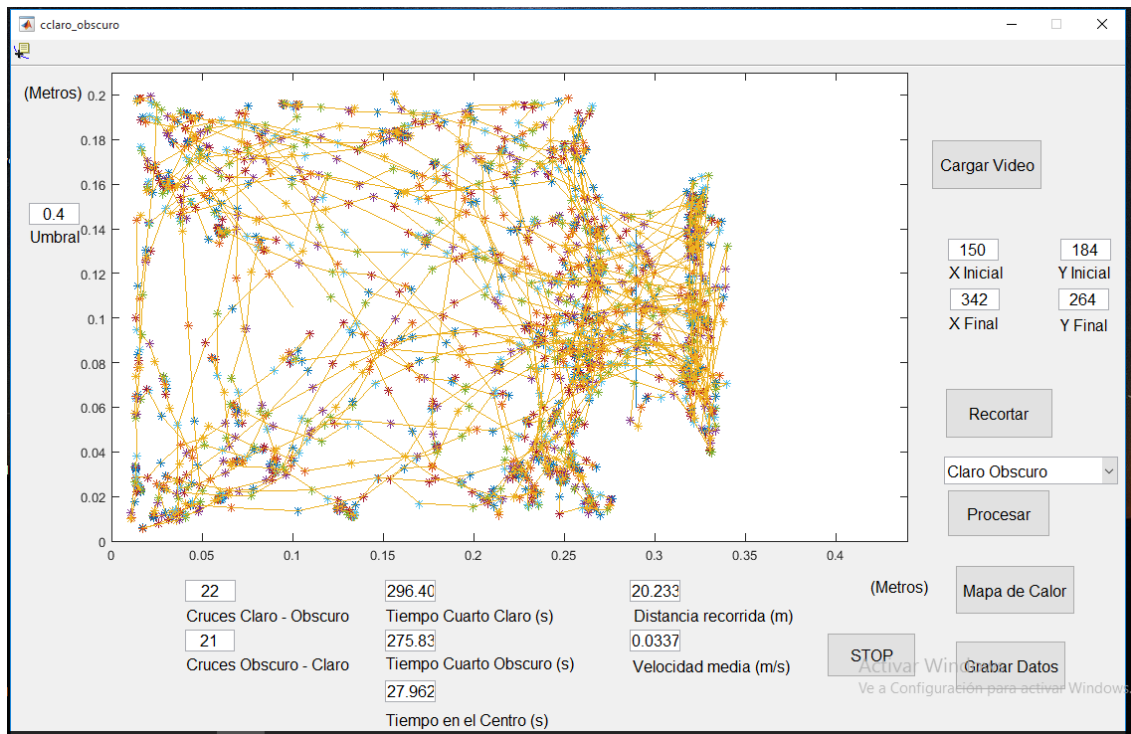
Realizado por: Michele Godoy, 2018

**Anexo. N:** Software ITOPI para el equipo de laberinto en cruz elevado



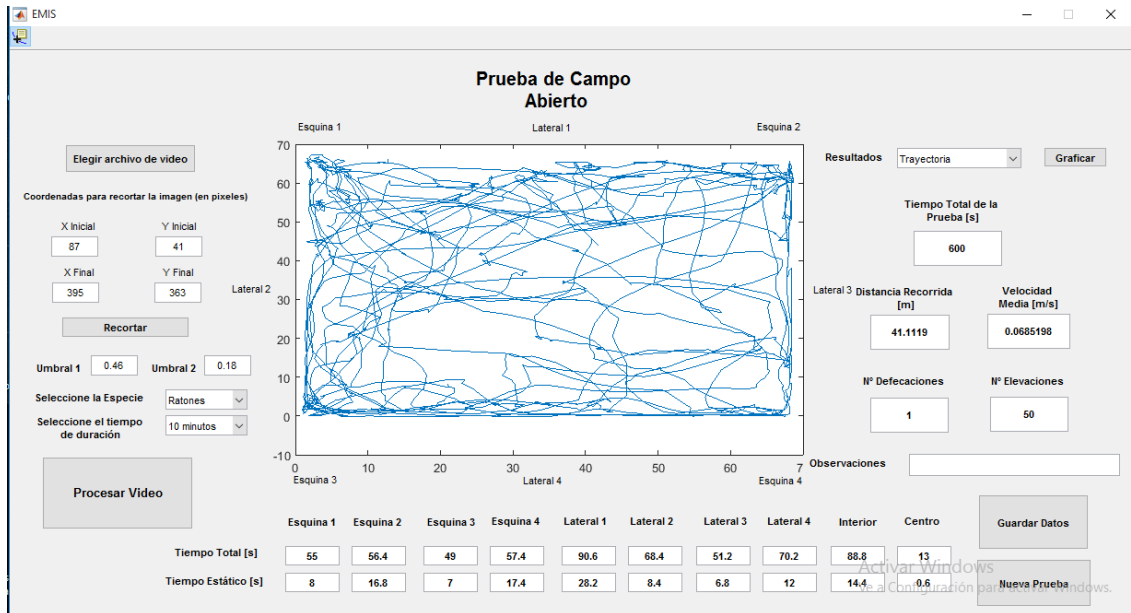
Realizado por: Michele Godoy, 2018

**Anexo. O:** Software TIPOTI para el equipo cuarto claro – oscuro



Realizado por: Michele Godoy, 2018

**Anexo. P:** Software EMIS para el equipo campo abierto



Realizado por: Michele Godoy, 2018