



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE TORONJIL (*Melissa officinalis*) EN RATONES (*Mus musculus*)”.

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL

Presentado para optar por el grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: YAJAYRA LIZBETH MEDINA GUALLPA

DIRECTORA: BQF. GISELA ALEXANDRA PILCO BONILLA, M.Sc

Riobamba-Ecuador

2019

©2019, Yajayra Lizbeth Medina Gualpa

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos por cualquier medio o procedimientos, 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 de Trabajo de Titulación certifica que el trabajo de investigación: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE TORONJIL (*Melissa officinalis*) EN RATONES (*Mus musculus*)”**, de responsabilidad de la señorita Yajayra Lizbeth Medina Guallpa, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Gisela Alexandra Pilco Bonilla, M.Sc

DIRECTORA DE TRABAJO

DE TITULACIÓN

BQF. Diego Renato Vinuesa Tapia, M.Sc

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, Yajayra Lizbeth Medina Guallpa, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este proyecto de titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Yajayra Lizbeth Medina Guallpa

C.I: 180478209-0

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios por brindarme salud, vida y por guiarme en cada paso que doy, por darme fuerzas y ganas para cumplir cada una de las metas que me propongo.

A mis padres Rodrigo Medina y Mirian Guallpa, por ser mi pilar fundamental, por brindarme su apoyo, amor, cariño, confianza, gracias por siempre estar ahí dándome palabras de aliento para salir adelante y luchar por mis sueños.

A mi padrino Claudio Pérez, mi angelito que ahora me mira desde el cielo, por convertirme en una mujer luchadora, y por siempre impulsarme a cumplir con mis metas.

A mi hermana Karen, por cada uno de sus consejos y apoyo incondicional en todo momento.

A mis abuelitos, tíos, primos, amigos por siempre estar pendientes y por brindarme su apoyo.

Yajayra.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por abrirme sus puertas y permitir formarme como persona y como profesional.

A mi tutora BQF. Gisela Pilco, por cada minuto de su tiempo, ayuda y apoyo durante la realización del trabajo de titulación.

Al BQF. Diego Vinuesa, que ha sido un gran aporte y ayuda durante todo el proceso de la investigación.

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

A Dios por ser parte fundamental de mi vida, por guiarme en cada una de las decisiones que tomo y por todas las bendiciones que me regala.

A mis padres por toda la confianza brindada, por su apoyo, sacrificio para reglarme el estudio y por sus palabras de ánimo. Gracias por tanto amor.

Agradezco de todo corazón a mi familia, por estar conmigo en buenos y malos momentos y sobre todo por su ayuda y apoyo en cada momento.

Yajayra.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIA.....	4
1.1. Antecedentes de la investigación.....	4
1.2. Bases teóricas.....	5
<i>1.2.1. Ansiedad.....</i>	<i>5</i>
<i>1.2.1.1. Definición.....</i>	<i>5</i>
<i>1.2.2. Causas.....</i>	<i>6</i>
<i>1.2.3. Etiopatogenia.....</i>	<i>6</i>
<i>1.2.3.1. Mecanismos neurobiológicos involucrados en los trastornos de ansiedad.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.4. Manifestaciones clínicas.....</i>	<i>8</i>
<i>1.2.5. Trastornos de la ansiedad.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.6. Tratamiento.....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.6.1. Terapia no farmacológica.....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.6.2. Terapia farmacológica.....</i>	<i>11</i>
<i>1.2.7. Fitoterapia.....</i>	<i>13</i>
<i>1.2.8. Familia Lamiaceae.....</i>	<i>13</i>
<i>1.2.8.1. Descripción botánica.....</i>	<i>13</i>
<i>1.2.8.2. Hábitat y Distribución.....</i>	<i>14</i>
<i>1.2.8.3. Aplicaciones.....</i>	<i>14</i>
<i>1.2.9. Toronjil (Melissa officinalis).....</i>	<i>15</i>
<i>1.2.9.1. Características botánicas.....</i>	<i>15</i>
<i>1.2.9.2. División Taxonómica.....</i>	<i>16</i>
<i>1.2.9.3. Hábitat y distribución.....</i>	<i>16</i>
<i>1.2.9.4. Composición química.....</i>	<i>17</i>

1.2.9.5.	Propiedades terapéuticas	17
1.2.10.	<i>Modelos animales</i>	18
1.2.10.1.	Modelos de respuestas condicionadas.....	18
1.2.10.2.	Modelos de respuestas no condicionadas.....	18

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	20
2.1.	Lugar de investigación	20
2.2.	Identificación de material vegetal.....	20
2.3.	Recolección de material vegetal	20
2.4.	Material vegetal.....	21
2.5.	Material biológico.....	21
2.5.1.	<i>Descripción</i>	21
2.6.	Materiales, equipos y reactivos	21
2.7.	Técnicas y Métodos	23
2.7.1.	<i>Recolección, lavado y secado del material vegetal.....</i>	24
2.7.2.	<i>Parámetros de control de calidad aplicados a la droga cruda</i>	24
2.7.2.1.	Determinación del contenido de humedad.....	24
2.7.2.2.	Determinación de cenizas totales.....	25
2.7.2.3.	Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico	25
2.7.2.4.	Determinación de cenizas solubles en agua	26
2.7.3.	<i>Tamizaje fitoquímico.....</i>	26
2.7.3.1.	Elaboración de los extractos para el tamizaje fitoquímico.....	27
2.7.4.	<i>Obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de TORONJIL.....</i> <i>(Melissa officinalis)</i>	29
2.7.5.	<i>Control de calidad del Extracto Hidroalcohólico.....</i>	29
2.7.5.1.	Requisitos organolépticos	29
2.7.5.2.	Determinación de densidad relativa.....	30
2.7.5.3.	Índice de refracción.....	30
2.7.5.4.	Medición de pH.....	30
2.7.5.5.	Determinación de sólidos totales	30
2.7.6.	<i>Preparación del extracto hidroalcohólico concentrado</i>	31
2.7.6.1.	Determinación de Flavonoides Totales.....	31
2.7.6.2.	Determinación de Fenoles Totales.....	31

2.7.7.	<i>Actividad ansiolítica</i>	32
2.7.7.1.	Equipo electrónico de medición “Cuarto Claro-Oscuro”.....	33
2.7.7.2.	Equipo electrónico de medición “laberinto elevado en cruz”.....	34
2.7.7.3.	Equipo electrónico de medición “Campo Abierto”.....	36
2.7.8.	<i>Procedimiento de utilización de equipos</i>	38
2.7.9.	<i>Análisis estadístico</i>	39

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
3.1.	Ensayos de Control de calidad de la Droga Cruda	40
3.2.	Tamizaje Fitoquímico	41
3.3.	Control de calidad de extracto hidroalcohólico de hojas de Toronjil <i>(Melissa officinalis)</i>	44
3.4.	Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu ...	45
3.5.	Cuantificación de Flavonoides Totales	46
3.6.	Actividad ansiolítica <i>in vivo</i>	47
3.6.1.	<i>Equipo electrónico de medición campo claro-oscuro</i>	47
3.6.1.1.	Tiempo en el cuarto claro y cuarto oscuro.....	47
3.6.1.2.	Número de cruces cuarto claro-oscuro, distancia recorrida y velocidad media...	50
3.6.2.	<i>Equipo electrónico de medición laberinto elevado en cruz</i>	54
3.6.2.1.	Tiempo en brazos abiertos y cerrados.....	54
3.6.2.2.	Entradas en brazos abiertos y cerrados	56
3.6.2.3.	Distancia recorrida y velocidad media.....	59
3.6.3.	<i>Equipo electrónico de medición campo abierto</i>	62
3.6.3.1.	Tiempo en el centro, interior, laterales y esquinas.....	62
3.6.3.2.	Número de defecaciones y elevaciones	65
3.6.3.3.	Distancia recorrida y velocidad media.....	68
3.6.4.	<i>Discusión general de los resultados</i>	71

CONCLUSIONES	74
---------------------------	-----------

RECOMENDACIONES	75
------------------------------	-----------

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Clasificación de los síntomas de ansiedad.....	8
Tabla 2-1:	Trastornos de la ansiedad	9
Tabla 3-1:	Taxonomía del Toronjil (<i>Melissa officinalis</i>).....	16
Tabla 1-2:	Listado de materiales, equipos y reactivos utilizados.....	21
Tabla 2-2:	Tratamientos, código, concentración y dosis para la evaluación de la actividad ansiolítica de <i>Melissa officinalis</i>	32
Tabla 3-2:	Parámetros a medir del “Cuarto Claro-Oscuro”	34
Tabla 4 2:	Parámetros a medir en el equipo “laberinto cruz elevado”	35
Tabla 5 2:	Parámetros a medir en el equipo “Campo Abierto”	37
Tabla 1-3:	Resultados obtenidos del Control de Calidad de droga cruda de <i>Melissa officinalis</i>	40
Tabla 2-3:	Resultados del tamizaje fitoquímico de los diferentes extractos de las hojas de Toronjil (<i>Melissa officinalis</i>).....	41
Tabla 3-3:	Resultados obtenidos del Control de Calidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de Toronjil (<i>Melissa officinalis</i>)	44
Tabla 4-3:	Resultados de la cuantificación de Fenoles Totales	45
Tabla 5-3:	Resultados de la Cuantificación de Flavonoide	46
Tabla 6-3:	Resultados obtenidos del tiempo en el cuarto claro y oscuro	47
Tabla 7-3:	Test ANOVA para tiempos en cuarto claro y oscuro	48
Tabla 8-3:	Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos de tiempo en Cuarto Claro y Cuarto Oscuro	49
Tabla 9-3:	Número de cruces cuarto claro-oscuro, distancia recorrida y velocidad media..	50
Tabla 10-3:	Test ANOVA para el número de cruces para cuarto claro-oscuro, distancia recorrida y velocidad media	52
Tabla 11-3:	Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos para el número de cruces para cuarto claro-oscuro, distancia recorrida y velocidad media	53
Tabla 12-3:	Resultados obtenidos del tiempo en brazos abiertos y cerrados.....	54
Tabla 13-3:	Test ANOVA para tiempo en brazos abiertos, medio y brazos cerrados	55
Tabla 14-3:	Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos de tiempo en brazos abieros, medio y brazos cerrados	56
Tabla 15-3:	Resultados obtenidos de entradas en brazos abiertos y cerrados.....	56

Tabla 16-3:	Test ANOVA para entradas a brazos abiertos y brazos cerrados	57
Tabla 17-3:	Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos de entradas a brazos abiertos y entradas a los brazos cerrados	58
Tabla 18-3:	Resultados obtenidos de la distancia recorrida y velocidad media.....	59
Tabla 19-3:	Test ANOVA para la distancia recorrida y velocidad media	60
Tabla 20-3:	Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos de distancia recorrida y velocidad media	61
Tabla 21-3:	Resultados obtenidos del Tiempo en el centro, interior, laterales y esquinas ...	62
Tabla 22-3:	Test ANOVA para tiempo de permanecía en el centro, interior, laterales y esquinas	63
Tabla 23-3:	Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos del tiempo de permanecía en el centro, interior, laterales y esquinas	64
Tabla 24-3:	Resultados obtenidos del número de elevaciones y defecaciones	65
Tabla 25-3:	Test de ANOVA para número de elevaciones y defecaciones	66
Tabla 26-3:	Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos para número de defecaciones y elevaciones	67
Tabla 27-3:	Resultados obtenidos de la distancia recorrida y velocidad media.....	68
Tabla 28-3:	Test ANOVA para distancia recorrida y velocidad media	69
Tabla 29-3:	Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos de distancia recorrida y velocidad media	70
Tabla 30-3:	Resumen estadístico de los grupos formados por el blanco control y las diferentes dosis, en los parámetros para determinar la actividad ansiolítica y sedante	71
Tabla 31-3:	Resumen estadístico de los grupos formado por el blanco, control y las diferentes, para evaluar la actividad locomotora	71

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Trastorno de la ansiedad	5
Figura 2 1:	Modelo neuroanatómico de la ansiedad	6
Figura 3-1:	Beneficios del Toronjil.....	15
Figura 1 2:	Metodología realizada para la evaluación de la actividad ansiolítica.....	23
Figura 2-2:	Esquema para el Tamizaje Fitoquímico.....	27
Figura 3-2:	Esquema de ensayos del extracto etéreo	28
Figura 4-2:	Esquema de ensayos del extracto alcohólico	28
Figura 5-2:	Esquema de ensayos del extracto acuoso.....	29
Figura 6-2:	Equipo electrónico de medición “Cuarto Claro-Oscuro”.....	33
Figura 7-2:	Aplicación ITOPI del “Cuarto Claro-Oscuro”	33
Figura 8-2:	Equipo electrónico de medición “laberinto cruz elevado”	34
Figura 9-2:	Aplicación ITOPI del “laberinto cruz elevado”	35
Figura 10-2:	Equipo electrónico de medición “Campo Abierto”	36
Figura 11-2:	Aplicación EMIS del “Campo Abierto”	36
Figura 12-2:	Flujograma para la evaluación la actividad ansiolítica.	38

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Tiempos de duración en Cuarto Claro y Oscuro obtenidos en los ensayos a diferentes concentraciones.....	62
Gráficos 2-3: Número de cruces en el cuarto Claro-Oscuro obtenidos en las pruebas a diferentes concentraciones.....	50
Gráficos 3-3: Distancia recorrida obtenida en los distintos tratamientos.....	51
Gráficos 4-3: Velocidad media obtenida de los diferentes tratamientos.....	51
Gráficos 5-3: Resultados obtenidos del Tiempo en Brazos Abiertos-Cerrados en los diferentes concentraciones.....	54
Gráficos 6-3: Número de entradas en brazos abiertos y cerrados obtenidas en los diferentes concentraciones.....	57
Gráficos 7-3: Distancia recorrida obtenida en los distintos tratamientos.....	59
Gráficos 8-3: Velocidad media obtenida de los diferentes tratamientos.....	60
Gráficos 9-3: Tiempo de permanencia en el centro, interior, laterales, esquinas obtenidos de los diferentes tratamientos.....	62
Gráficos 10-3: Número de elevaciones y defecaciones obtenidos en los distintos tratamientos..	66
Gráficos 11-3: Distancia recorrida obtenida en los diferentes tratamientos.....	68
Gráficos 12-3: Velocidad media obtenida en los diferentes tratamientos.....	69

INDICE DE ANEXOS

- ANEXOS A:** Preparación del material vegetal Toronjil (*Melissa officinalis*)
- ANEXOS B:** Control de calidad de la droga cruda
- ANEXOS C:** Tamizaje Fitoquímico
- ANEXOS D:** Control de Calidad del Extracto Hidroalcohólico de Toronjil (*Melissa officinalis*)
- ANEXOS E:** Obtención del extracto Hidroalcohólico de Toronjil (*Melissa officinalis*)
- ANEXOS F:** Cuantificación de Fenoles totales
- ANEXOS G:** Cuantificación de Flavonoides totales
- ANEXOS H:** Ambientación de los ratones (*Mus musculus*) en el Bioterio de la ESPOCH
- ANEXOS I:** Extracto Hidroalcohólico concentrado de *Melissa officinalis* reconstituido en propilenglicol al 15%
- ANEXOS J:** Administración en rat ones (*Mus musculus*)
- ANEXOS K:** Equipo electrónico para “Cuarto Claro Oscuro”
- ANEXOS L:** Equipo electrónico para “Laberinto Elevado en Cruz”
- ANEXOS M:** Equipo electrónico para “Campo Abierto”
- ANEXOS N:** Permiso de Movilización de la planta
- ANEXOS O:** Identificación de *Melissa officinalis* por parte del Botánico

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad ansiolítica del extracto hidroalcohólico de las hojas de toronjil (*Melissa officinalis*) en ratones (*Mus musculus*). El material vegetal se recolectó y acondicionó. El extracto se obtuvo por maceración de 50 g de planta seca y 500 mL del etanol al 70% y se concentró. Se efectuó el control de calidad de la droga seca y del extracto concentrado, se identificaron los metabolitos secundarios presentes a través del tamizaje fitoquímico. Para la evaluación de la actividad ansiolítica, se utilizó 25 ratones hembras con un peso aproximado de 25-30 g y como tratamiento se administró el extracto a concentraciones de 25, 100 y 200 mg/Kg, propilenglicol al 15% (blanco) y Clonazepam (control positivo). Los modelos de respuesta no condicionada usados fueron: Cuarto claro-oscuro (CCO), Laberinto cruz elevado (LCE) y campo abierto (CA). Los datos fueron grabados con una cámara D-View Cam (D-Link), y se procesaron en dos programas: ITOPI para los equipos cuarto claro-oscuro y laberinto en cruz elevado y para el campo abierto el programa EMIS. Los resultados fueron analizados en el programa IBM SPSS Statistics 25 concluyendo que las dosis que presentaron actividad ansiolítica significativa fueron de 100 y 200 mg/Kg, estas concentraciones no afectan la actividad motora de los ratones. Se recomienda continuar con estudios de toxicidad para *Melissa officinalis* y así garantizar su uso.

Palabras Clave: <BIOQUÍMICA>, <FARMACIA>, <ACTIVIDAD ANSIOLITICA>, <EXTRACTO HIDROALCOHOLICO>, <TORONJIL (*Melissa officinalis*)>, <RATONES (*Mus musculus*)>, <CUARTO CLARO OSCURO (CCO)>, <LABERINTO EN CRUZ ELEVADO (LCE)>, <CAMPO ABIERTO (CA)>.

ABSTRACT

The objective of this investigation was to evaluate the anxiolytic activity of the hydroalcoholic extract of Melissa leaves (*Melissa officinalis*) in mice (*Mus musculus*). The plant material was collected and conditioned. The extract was obtained by maceration of 50 g of dry plant and 500 mL of 70% ethanol and concentrated. The quality control of the dry drug and the concentrated extract was carried out, the secondary metabolites present through phytochemical screening were identified. For the evaluation of the anxiolytic activity, 25 female mice with an approximate weight of 25-30 g were used and, as a treatment, the extract was administered at concentrations of 25, 100 and 200 mg/Kg, 15% propylene glycol (white) and Clonazepam (positive control). The unconditional response models used were: Light-dark room (CCO), Labyrinth high cross (LCE) and open field (CA). The data was recorded with a D-View Cam camera (D-Link), and processed in two programs: ITOPI for the fourth light-dark equipment and elevated cross labyrinth and for the open field the EMIS program. The results were analyzed in the IBM SPSS Statistics 25 program concluding that the doses that presented significant anxiolytic activity were 100 and 200 mg / Kg, these concentrations do not affect the motor activity of the mice. It is recommended to continue with toxicity studies for *Melissa officinalis* and thus guarantee its use.

KEY WORDS: <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACY>, <ANSIOLYTIC ACTIVITY>, <HYDRO-ALCOHOLIC EXTRACT>, <TORONJIL (*Melissa officinalis*)>, <MICE (*Mus musculus*)>, <CUARTO DARK CLEAR (CCO)>, <LABERINTO EN CRUZ ELEVATED (LCE)>, <OPEN FIELD (CA)>.

INTRODUCCIÓN

La ansiedad es un estado emocional, las personas que se ven afectadas, sienten intranquilidad, desesperación e inseguridad. Estas reacciones son consideradas normales cuando la intensidad, duración y frecuencia no son excesivas. La ansiedad se puede dividir en dos tipos: la primera la ansiedad adaptativa que es un estado natural y que mantiene alerta a la persona en eventos estresantes; y la patológica establecida cuando la intensidad aumenta y provoca malestares significativos.

Las causas principales de los trastornos de ansiedad no están del todo claras, pero se encuentran relacionadas con los acontecimientos traumáticos. Los signos y síntomas más frecuentes son: sensación de nerviosismo, agitación, pánico, aumento en la frecuencia cardíaca, hiperventilación, sudoración, temblores y problemas para concentrarse, etc.

A nivel mundial, la ansiedad forma parte de las complicaciones más graves de la salud pública afectando a un 7% de la población. Las personas que lo padecen sufren consecuencias negativas que afectan significativamente la calidad de vida. En Latinoamérica, los trastornos de ansiedad en niños y adolescentes son un problema frecuente con cifras entre el 5% y el 18%, siendo uno de los factores de morbilidad y deterioro en la vida social y académica, incluso puede llevar a depresión, intentos de suicidio, abuso de sustancias, y dificultad para relacionarse con los demás (Virues, 2005, pp. 6-8).

El tratamiento farmacológico de la ansiedad incluye ansiolíticos y antidepresivos, pero estos deben ser prescritos por un médico y jamás se deben tomar por cuenta propia. Lastimosamente, éstos presentan graves efectos adversos en el organismo, además de que pueden provocar tolerancia y dependencia, afectando a mediano o largo plazo las funciones cognitivas, la memoria y la atención. Por lo cual en los últimos años se ha empezado a usar tratamientos alternativos.

Las especies vegetales presentan diversos usos y efectos biológicos entre los cuales se destacan la actividad ansiolítica, ansiolítica, fotoprotectora, analgésica, etc. Sin embargo, el principal problema radica en que la mayoría de las plantas medicinales todavía necesitan ser estudiadas a profundidad desde la perspectiva científica, a pesar de la larga experiencia obtenida de su uso tradicional.

Desde la aparición de los fármacos obtenidos a través de procesos químicos, los médicos se olvidaron de las plantas medicinales limitándose a recetar medicamentos costosos o difíciles de conseguir. Por lo que la fitoterapia es considerada una alternativa no solo por sus ventajas económicas sino biológicas.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

- Evaluar la actividad ansiolítica del extracto hidroalcohólico de las hojas de Toronjil (*Melissa officinalis*) en ratones (*Mus musculus*).

Objetivos Específicos

- Determinar los metabolitos secundarios presentes en las hojas de Toronjil (*Melissa officinalis*).
- Cuantificar la cantidad de fenoles y flavonoides presentes en las hojas de Toronjil (*Melissa officinalis*) mediante el método de $AlCl_3$ y el reactivo de Folin Ciocalteu.
- Establecer la concentración del extracto Hidroalcohólico de Toronjil (*Melissa officinalis*), con mayor actividad ansiolítica en ratones (*Mus musculus*).

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIA

1.1. Antecedentes de la investigación

Muchas especies vegetales son empleadas con fines medicinales, éstas contienen principios activos que, administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos frente a enfermedades y trastornos que presentan las personas. Se calcula que, de 260000 especies, el 10% presentan actividades medicinales (Pérez y González, 2015, p. 12).

Entre los cuales encontramos al Toronjil (*Melissa officinalis*) que es un arbusto de 60-90 cm de altura, que puede encontrarse naturalmente en zonas húmedas o incluso en praderas sombrías de los Andes ecuatorianos. En la medicina popular se usa contra la ansiedad y la depresión, así como para calmar las palpitaciones del corazón (Infojardín, 2017, p. 3).

Actualmente se consume como una infusión tónica y sedante que, según el conocimiento tradicional, contiene la fórmula de la longevidad. Una infusión de sus hojas calma los nervios, disminuye el cansancio, ayuda en la memoria y a un mejor entendimiento (MHT, 2013, pp 1 -2).

Se pudo determinar cierta actividad relajante del extracto de *Melissa officinalis* en un experimento realizado en células de músculo liso extraída de ratas. Se conoce que el aceite esencial posee una marcada actividad antibacteriana, antioxidante y antifúngica (Vázquez, 2015, pp 5-8).

Actualmente, existen pacientes que no tienen acceso a la medicina moderna ya sea por el costo, la distancia, etc. Por lo que una alternativa a la medicina química se presenta en las plantas medicinales que mejoran la salud de las personas siendo más accesibles y económicas.

1.2. Bases teóricas

1.2.1. *Ansiedad*

1.2.1.1. *Definición*

La ansiedad es un trastorno neurológico, llegando a ser una respuesta del individuo a situaciones de alerta o estrés. Proviene del latín “*anger*” que significa, estado de angustia y privación, induciendo en las personas preocupaciones intensa y permanente que es difícil de controlar, poniendo en un estado de defensa frente a situaciones de temor desagradables (Torres y Chávez, 2013, p. 1).

La ansiedad es un estado normal de las personas cuando su intensidad y duración son mínimas, se convierte en patológica cuando la amenaza se ve distorsionada. Este trastorno es muy severo y agudo que puede transformándose en pánico llegando incluso a paralizar al individuo (Virues, 2015, p. 6).



Figura 1-1: Trastorno de la ansiedad

Fuente: (Robledo, 2018, p.1)

1.2.2. Causas

No se puede definir completamente cuáles son las causas que provocan la ansiedad. Ciertas circunstancias, como acontecimientos traumáticos, parecen provocar este trastorno en las personas. Los rasgos heredados también pueden ser un factor (Mayo Clinic, 2017, p. 2). En algunos casos la ansiedad es un problema de salud no diagnosticado, que puede estar asociado a otros problemas de salud como: enfermedades cardíacas, respiratorias, diabetes, hipertiroidismo, dolores crónicos, abstinencia de alcohol y medicamentos, tumores raros que producen ciertas hormonas relacionadas con la respuesta de lucha o huida, entre otras (Mayo Clinic, 2017, pp. 2-3).

1.2.3. Etiopatogenia

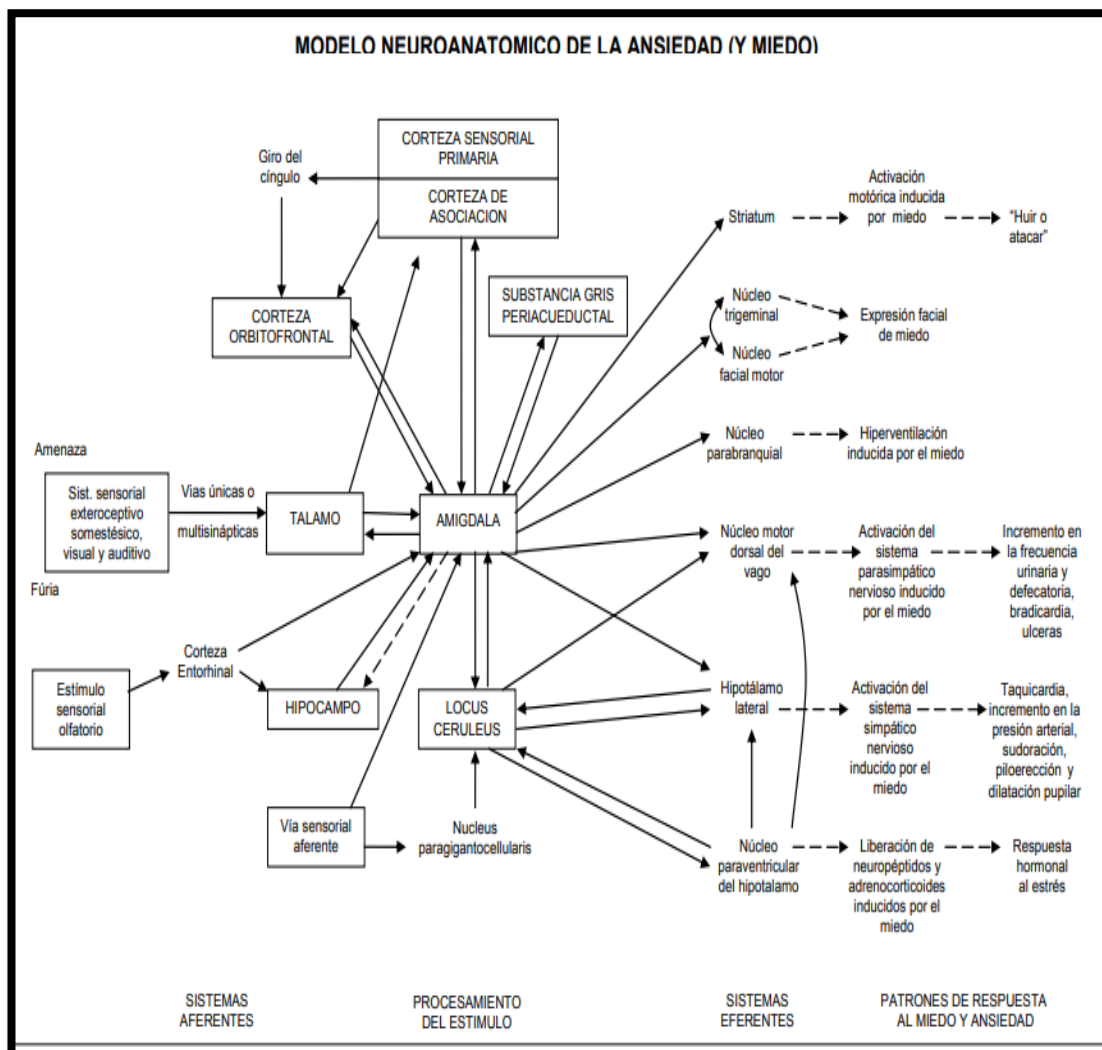


Figura 2 1: Modelo neuroanatómico de la ansiedad
Fuente: (Reyes, 2015, p.18)

La ansiedad constituye un modelo complejo, donde interactúan múltiples factores: biológicos, psicodinámicos, sociales, traumáticos y de aprendizaje. Desde el punto de vista neurobiológico, este trastorno tiene su base en zonas del tallo cerebral, que participan en la transmisión e impulso de angustia, además del hipocampo y la amígdala pertenecientes al sistema límbico (Navas y Vargas, 2012, p. 6).

Uno de los neurotransmisores de acción inhibitoria es el GABA que actúa como ansiolítico. El sistema serotoninérgico también es importante, ya que en estrecha interacción con la adrenalina y la dopamina juega un papel tranquilizante o lo contrario. Ciertas hormonas tienen un rol destacado en todo lo relativo al estrés (cortisol, ACTH, etc.) y en la ansiedad (Navas y Vargas, 2012, p. 6).

1.2.3.1. Mecanismos neurobiológicos involucrados en los trastornos de ansiedad

- **Hiperactividad adrenérgica:** producida por la estimulación eléctrica del locus ceruleus, que provoca el aumento de noradrenalina, adrenalina y metabolitos, después de someter a estrés emocional a los individuos. Se da un aumento del metohidroxifenilglicol (MHPG) en la orina y el líquido cefalorraquídeo, en pacientes que suspenden de manera abrupta los antidepresivos y síndromes de abstinencia de alcohol y opiáceos. Se produce hipersensibilidad en los receptores betaadrenérgicos en las fobias sociales (Reyes, 2015, p. 11).
- **Hiposensibilidad de los receptores GABA-benzodicepínicos:** El receptor postsináptico GABA-A, presenta un canal de cloro, por lo cual está asociado a los receptores benzodicepínicos, se encuentran en abundancia en el sistema límbico, cerebelo, corteza, núcleo estriado (Reyes, 2015, p. 12).

El flujo de cloro aumenta cuando se activa el receptor GABA-A, provocando una acción inhibitoria y reduciendo la excitabilidad neuronal. Al estimular al receptor presináptico GABA-B, inhibe la liberación de GABA y algunos aminoácidos excitatorios. Los receptores benzodicepínicos ubicados en la subunidad alfa del receptor GABA-A, se unen a las benzodicepinas y el etanol. Para los trastornos por pánico se utiliza el ácido valproico (fármaco GABAérgico) (Reyes, 2015, p. 12).

- **Disfunción Serotoninérgica:** estudios demuestran que en los trastornos de fobia social, pánico y obsesivo-compulsivo, se da un aumento de serotonina, por lo cual se utilizan inhibidores de la recaptación de serotonina en estos trastornos, demostrando efectividad (Reyes, 2015, p. 13).

Los niveles de serotonina son fundamentales en la ansiedad, no se ha podido determinar si este trastorno está provocado por un déficit o exceso de este neurotransmisor o esta provocado por un cambio en la sensibilidad de los receptores serotoninérgicos pre y postsinápticos. Estudios demuestran que en los trastornos por ansiedad generalizada y pánico existe disminución de serotonina en el plasma y en líquido cefalorraquídeo (Reyes, 2015, p. 13).

1.2.4. *Manifestaciones clínicas*

La ansiedad afecta los procesos mentales, provocando distorsiones de la percepción de la realidad, del entorno y de sí mismo, afecta la capacidad de análisis y la funcionalidad de la persona (Castañeda *et al.*, 2010, pp. 8–9). Podemos clasificar los síntomas de ansiedad en varios grupos:

Tabla 1-1: Clasificación de los síntomas de ansiedad

Físicos	Taquicardia, sudoración, falta de aire, palpitaciones, náuseas, vómitos, tensión, rigidez en los músculos, mareo e inestabilidad.
Psicológicos	Entre los síntomas físicos se destacan los siguientes: agobio, amenaza, ganas de huir, sensación de vacío, dificultad a la hora de tomar decisiones, temor a la muerte.
Relativos a la conducta	Dificultades para actuar, impulsividad, dificultad para estarse quieto.
Intelectuales o cognitivos	Problemas de atención, concentración, y memoria. Preocupación excesiva, pensamientos distorsionados etc.
Sociales	Puede producirse irritabilidad, bloqueos, dificultad para expresar opiniones propias

Fuente: (CLÍNICA DE LA ANSIEDAD, 2018).

Realizado por: Yajayra Medina, 2019.

1.2.5. *Trastornos de la ansiedad*

Tabla 2-1: Trastornos de la ansiedad

Fobias simples	<p>Caracterizado por un miedo irracional y agudo, desencadenado por la presencia de una situación específica (animales, sangre, alturas, tormentas, aviones, elevadores) (Martínez y López, 2011, p. 2).</p> <p>Presenta el 8,6% de incidencia anual, afecta principalmente a mujeres. Los síntomas físicos más comunes son: temblores, falta de aire, palpitaciones y sudoración. Es recomendado la psicoterapia, con la posibilidad de una ayuda farmacológica (Pastrana, 2012, pp. 2–3).</p>
Fobia social	<p>Las personas con este trastorno sienten miedo intenso, persistente y crónico a ser vistas y juzgadas por otras personas, se sienten incómodas al hablar en público, comer, beber o escribir delante de otros, afectando su desempeño en el ámbito laboral, cognitivo y social. Los síntomas más frecuentes son: falta de aire, palpitaciones, sudoración profusa, temblor, náuseas y dificultad para hablar. Aproximadamente el 7% de la población presenta fobia social. El tratamiento incluye terapia y fármacos (Pastrana, 2012, pp. 2–3)</p>
Trastorno de angustia / trastorno de pánico	<p>Se da por la presencia de crisis de pánico inesperadas, se caracteriza por la presencia de miedo excesivo, sus síntomas físicos son temblores, palpitaciones, sudoraciones y falta de aire. Su duración es de aproximadamente 10 minutos, afecta a las mujeres con una incidencia del 2,7%. Los estudios genéticos señalan que esta enfermedad se pueda heredar. El tratamiento se basa en uno o varios fármacos y la utilización de psicoterapias específicas, preferentemente de forma combinada (Pastrana, 2012, pp. 2–3)</p>
Trastorno de estrés postraumático (TEPT)	<p>Se presenta cuando el paciente está expuesto a un acontecimiento traumático, afectando su integridad física o la de los demás personas y se caracteriza por la reexperimentación del evento como recuerdos recurrentes, sus síntomas debido al aumento de la activación (irritabilidad, hipervigilancia, dificultades para conciliar o mantener el sueño) (Martínez y López, 2011, p. 2).</p> <p>Se considera que el 3,5% de los adultos padecen TEPT, pero aparecen a cualquier edad y afecta tanto a mujeres como hombres. Esta enfermedad puede ser tratada de forma efectiva con algunos medicamentos y con psicoterapias (Pastrana, 2012, pp. 2–3).</p>

Trastorno obsesivo compulsivo (TOC)	<p>Se caracteriza por la presencia de obsesiones (pensamientos, impulsos o imágenes recurrentes y persistentes que causan malestar o ansiedad significativa) y de compulsiones que son comportamientos o actos mentales de carácter repetitivo que se realizan para disminuir la ansiedad (Martínez y López, 2011, p. 2).</p> <p>Las obsesiones suelen llevar a conductas compulsivas, una de cada 100 personas tiene esta enfermedad. El tratamiento se basa en la utilización de fármacos específicos y de psicoterapias centradas en la conducta y pensamientos. Se están utilizando nuevas técnicas como, estimulación magnética transcraneal y estimulación cerebral profunda (Pastrana, 2012, pp. 2–3).</p>
Trastorno de ansiedad generalizada (TAG)	<p>Las personas con TAG suelen ir a lo largo de todo el día tensos y con preocupaciones excesivas, ya sea por salud, dinero, pareja, familia, trabajo. El TAG puede producir fatiga, inquietud, irritabilidad, dolores de cabeza y tensión muscular elevada. Para diagnosticar el paciente debe presentar estos síntomas durante más de 6 meses, el tratamiento para este trastorno incluye fármacos y terapias cognitivo-conductual (Pastrana, 2012, pp. 2–3).</p>
Trastorno de ansiedad inducido por sustancias	<p>Está asociado a los efectos secundarios que provocan ciertos fármacos, hay que tener en cuenta que el abuso progresivo de sustancias puede provocar la aparición de otros trastornos de ansiedad más severos (Martínez y López, 2011, p. 2).</p>

Fuente: (CLÍNICA DE LA ANSIEDAD, 2018).

Realizado por: Yajayra Medina, 2019.

1.2.6. *Tratamiento*

1.2.6.1. *Terapia no farmacológica*

Esta terapia se basa en que el paciente debe experimentar una situación de amenaza, provocando un estado de alerta, esta técnica se realiza para demostrar al paciente que no se encuentra en ningún riesgo y es innecesario sentir inseguridad (Gobierno Federal, 2010, pp 4-5).

En este tipo de procedimiento se tiene:

- **Tratamiento psicológico:** También llamada psicoterapia, proceso por el cual un experto en salud mental (psicólogo, psiquiatra, entre otros), ayuda al paciente a determinar cuáles son las causa del trastorno de ansiedad y cómo sobrellevar los síntomas (Craske et al, 2014, pp. 24–25).
- **Tratamiento cognitivo-conductual (TCC):** técnica útil para los trastornos de ansiedad, existe evidencia científica de su eficacia. Se basa en la detección de los patrones de pensamiento y comportamientos no deseados ante estímulos temidos, sustituyéndolos por otros más adaptativos y satisfactorios. Dura aproximadamente 12 semanas. La medicación se puede combinar con psicoterapia para trastornos de ansiedad específicos (Craske et al, 2014, pp. 24–25).
- **Tratamiento de psicoeducación:** esta terapia ayuda al paciente enfrentar situaciones amenazantes (Chávez y Torres, 2013, pp. 3-5).

1.2.6.2. *Terapia farmacológica*

- **Antidepresivos:** medicamentos de origen sintético, que ejerce su acción a partir de la 4-6 semana de tratamiento. Entre los principales encontramos a los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, a medida que pasan los días las dosis deben ser aumentadas, para obtener los resultados deseados.

Se puede administrar la Clomipramina y Imipramina (antidepresivos tricíclicos), pero hay que tener en cuenta que estos medicamentos provocan los efectos adversos como sueño, mareos, aumento de peso y sequedad en la boca (Chávez y Torres, 2013, p. 4).

- **Bloqueadores β :** se utiliza el propanolol principalmente para prevenir problemas cardiacos y para las manifestaciones físicas en los trastornos por fobias sociales (Chávez y Torres, 2013, p. 4).

- **Ansiolíticos:** aquí encontramos a las benzodiazepinas que son uno de los medicamentos más efectivos en el tratamiento de la ansiedad, una de las principales ventajas es que no provocan somnolencia, pero sus desventajas es que se debe aumentar la dosis para mantener su efecto, hay que tener en cuenta que estos fármacos deben ser prescritos por corto tiempo, debido a que causan dependencia en las personas que lo consumen (Chávez y Torres, 2013, pp. 3-5)

Los benzodiazepinas se unen al receptor de GABA y potencian la acción hiperpolarizante e inhibidora de este neurotransmisor. Dentro de los efectos adversos que se pueden presentar incluyen ataxia, vértigo, incoordinación motora con caídas, sedación, somnolencia, dificultad para mantener la atención, trastornos de memoria a corto plazo, e incluso el desarrollo de depresión (Navas y Vargas, 2012, p. 10).

Mecanismo de acción: las benzodiazepinas se unen al receptor GABA (ácido gamma-aminobutírico). Este medicamento específicamente, aumentan la actividad del neurotransmisor GABA, disminuyendo la excitación de las neuronas, a través de la reducción de la cantidad de los iones de cloro y así provocando un efecto sedante en el cerebro. Su mecanismo de acción varía de acuerdo al medicamento, pero todos potencian la actividad del GABA (Viviendo la salud, 2012, p. 3).

Efectos adversos: estos pueden variar de acuerdo a la gravedad e intensidad de los síntomas, se observan efectos toxicológicos similares en los medicamentos benzodiazepínicos (LIFEDER, 2017, p. 2).

Los individuos tratados con estos fármacos presentan principalmente mareos, sedación, diarrea, vómitos, hepatitis, urticaria, cambios en el estado de ánimo, alteraciones urinarias, ictericia, dermatitis, urticaria, discrasias sanguíneas, entre otras (LIFEDER, 2017, p. 2).

1.2.7. Fitoterapia

Se basa en la utilización de plantas medicinales, o partes de ellas con fines terapéuticos, donde el empirismo de la medicina tradicional se transforma en fundamento científico, es decir, se ponen a prueba y así se logra validar o descartar el uso popular, asegurando su correcto uso, eficacia y seguridad. La OMS reconoce la importancia de las plantas medicinales en el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades, como también la relevancia a nivel económico al ser una fuente de descubrimiento de nuevas drogas que en algunos casos tiene un costo muy inferior a la síntesis de nuevos fármacos (Avello y Cisternas, 2010, pp. 1288–1289).

A diferencia de la medicina sintética o convencional, la fitoterapia utiliza matrices vegetales complejas. Estas matrices las constituyen plantas enteras, partes de ellas (hojas, raíces, etc.). Los tratamientos son tratados con distintos disolvente que concentre los compuestos afines y facilite su administración (Avello y Cisternas, 2010, pp. 1288–1289).

La fitoterapia actúa como una medicina alopática utilizando principios activos capaces de contrarrestar el problema. La diferencia entre un producto fitoterápico y uno de síntesis química, se basa en que parte del compuesto ejerce la actividad biológica. Así, el medicamento posee una molécula aislada que presenta el efecto mientras el fitoterápico basa su efectividad en el fitocomplejo, es decir, el conjunto de los principios activos y los demás componentes naturales contenidos en la droga (Ramón *et al.*, 2011, p. 260).

1.2.8. Familia Lamiaceae

1.2.8.1. Descripción botánica

La familia de las Labiadas o Lamiáceas pertenece al orden Lamiales. Son arbustos que comprenden tanto formas herbáceas, anuales y perennes. Las plantas alcanzan hasta 1 metro de altura y crecen, normalmente, sobre suelos calizos o calizos-dolomíticos (ECURED, 2018, p. 2).

Presenta:

- **Tallos:** forma cuadrangular, generalmente aromáticas.
- **Hojas:** opuestas, enteras o divididas. Presentan aromas particulares por los aceites volátiles que presentan en sus glándulas.
- **Flores:** hermafroditas, zigomorfas, forman inflorescencias, estambres de flores sobrepuestos.
- **Cáliz:** 5 sépalos soldados.
- **Corola:** 5 pétalos generalmente bilabiada, 2-4 estambres libres.
- **Gineceo:** ovario súpero de 2 carpelos, 1 estilo y 2 estigmas.
- **Fruto:** envuelto por el cáliz persistente y un tetraquenio, compuesto por 4 núculas.
- **Semillas:** raras excepciones, de endospermo (Fiori y Bég, 2015, p. 7)

1.2.8.2. *Hábitat y Distribución*

Presenta una distribución mundial, con preferencia en las zonas templadas, aunque es posible encontrar géneros como *Hyptis* y *Asterohyptis*, que habitan en zonas secas y calientes (Martinez, et al., 2013, pp. 3-2). La familia Lamiaceae es una familia muy diversa, incluye 236 géneros y 7173 especies (Di Sapio et al, 2012, pp. 4-6).

En la familia Lamiaceae encontramos principalmente la menta, hierba buena, poleo, entre las cuales las características principales de estas especies son que contienen esencias aromáticas, el orégano, albahaca, tomillo, mejorana entre otras son utilizadas como condimentos. También existen especies que se utilizan como ornamentales entre las cuales encontramos a la lavanda (EcuRed, 2018, p. 1).

1.2.8.3. *Aplicaciones*

Esta familia tiene importancia económica en varias partes del mundo, ya que muchas de sus especies se usan como: condimentos (*Mentha*, *Origanum*, *Thymus*), ornamentales (*Salvia*, *Coleus*, *Scutellaria*) y sus aceites esenciales (Lavándula, Pogostemon, Salvia). Las especies son utilizadas en medicina casera, perfumería o en alimentación debido a sus propiedades aromáticas (Universidad de Valencia, 2016, p. 22).

En la medicina ancestral se utiliza los tallos, hojas y flores secas, para tratar enfermedades como: dolores estomacales, reumatismo, antigripales, anticatarrales, cicatrizante, tranquilizante, entre otros usos. Esta familia son muy ricas en aceites esenciales como los taninos, geraniol, acetato de linalino y borneol, estas utilizan ampliamente en cosmética (ECURED, 2018, p. 2).

1.2.9. Toronjil (*Melissa officinalis*)



Figura 3-1: Beneficios del Toronjil

Fuente: <https://saludesposible.com/beneficios-del-toronjil-melisa/>

1.2.9.1. Características botánicas

Su nombre común es: Toronjil, melisa, citronela, limonera, es una planta herbácea, perenne, pubescente, erguida, con olor típico a limón o toronja que se desprenden de sus hojas, que puede llegar a alcanzar los 80 cm. de altura. Esta planta tiene un aspecto parecido a la ortiga (López, 2008, pp. 1–2).

- **Hojas:** ovadas, crenado-dentadas, ápice obtuso, pecioladas, algo pubescentes, nervios prominentes.
- Brácteas lanceoladas, pubescentes.
- **Cáliz:** bilabiado con pubescencia variable, pelos cortos y largos.
- **Corola:** blanca amarillenta, externamente pubescente.
- **Estambres:** superiores insertos en la parte superior del tubo, los inferiores más abajo, filamentos glabros.
- **Estilo:** con ramas estigmáticas sub-iguales con pelos cortos esparcidos (Orfila Y Farina, 2012, p. 9).

1.2.9.2. División Taxonómica

Tabla 3-1: Taxonomía del Toronjil (*Melissa officinalis*)

TAXONOMÍA	
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
Filo	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Lamiaceae</i>
Género	<i>Melissa</i>
Especie	<i>Melissa officinalis L.</i>

Fuente: (Educación Helvética S. A., 2018, pp. 2-3).

Realizado por: Yajayra Medina, 2019.

1.2.9.3. Hábitat y distribución

Originaria de la Región Mediterránea Oriental, difundida por el cultivo, se ha naturalizado en toda la Europa templada. Este género de tres especies de hierbas perennes se encuentra desde Europa hasta el Asia central. El nombre *Melissa* proviene de una palabra griega que significa “abeja”, por atraer a los insectos gracias al néctar de sus flores (Renobales y Sallés, 2001, p. 1).

El toronjil es resistente a las heladas, prefiere estar a pleno sol o sombra. El suelo idóneo es húmedo y bien drenado. Crece de forma silvestre en prados húmedos, claros de bosque, a la orilla de los ríos y campos cultivados, sobre suelos ricos en materia orgánica. Se multiplican por semillas en primavera. A finales de verano da florecillas blancas, que atraen a las abejas polinizadoras al jardín. La *Melissa* se extiende con rapidez y se seca hasta el suelo en invierno, pero rebrota en primavera (Dueñas, 2012, p. 12).

Melissa officinalis puede crecer de forma silvestre especialmente en lugares cálidos, húmedos que sean ricos en materia orgánica, son fáciles de cultivar y recolectar, aunque es muy importante tomar en cuenta cuando se lo va a recolectar (López, 2008, pp. 1-2).

1.2.9.4. *Composición química*

Las hojas de Melissa contienen:

- **Aceite esencial:** sesquiterpenos (betacariofileno, germacreno) y monoterpenos con función aldehído: citral A y B (geranial, neral y linalol) y triterpenos (ácidos ursólico y oleanólico).
- **Ácidos fenólicos:** derivados del ácido hidroxicinámico como el Ácido rosmarínico, caféico, clorogénico.
- **Flavonoides:** como el quercitrósido, derivados de apigenina, luteolina, quercetol y kenferol. (Carretero, 2012, pp. 16-17).
- También podemos encontrar a los taninos, marrubina, saponinas y compuestos amargos (López, 2008, pp. 1-2).

1.2.9.5. *Propiedades terapéuticas*

Desde la antigüedad los romanos y griegos han utilizado *Melissa officinalis* para distintas afecciones en la salud, son empleados por sus efectos beneficios en las picaduras, heridas y para la memoria. Se utiliza en la medicina tradicional para problemas estomacales, fiebre, catarro, insomnio, para el hipertiroidismo además de ser eficaz como analgésico, sedantes, antioxidante, ansiolítico, hipoglucemiante, protectora hepática, antibacteriana, antifúngica, antiviral, etc. Investigaciones recientes indican que *Melissa officinalis* tiene un papel fundamental en la enfermedad de Alzheimer (Carretero, 2012, pp. 2-6).

Esta planta gracias a sus metabolitos presenta distintas actividades terapéuticas entre las cuales encontramos a los ácidos caféico y oleanólico en conjunto con sus alcoholes y terpenos poseen un efecto sedante y balsámico, además de disminuir la ansiedad y nerviosismo. Por la presencia de polifenoles y taninos es utilizada como antipirética, carminativa y para tratar el asma. Presenta además ácido protocatequico por lo cual es utilizada como antiespasmódicas. Los efectos analgésicos se deben a los ácidos ursólico, clorogénico y caféico, así como del timol y el eugenol. Presentan efectos sedantes y analgésicos por lo cual son utilizados en el insomnio dolor de oído y muela (López, 2008, pp. 1-2).

1.2.10. Modelos animales

1.2.10.1. Modelos de respuestas condicionadas

Modelo mediante el cual con un choque eléctrico aplicado en el animal se recibe una respuesta específica, esta es una técnica dolorosa y agresiva para quién lo recibe. Para la realización de estas pruebas se necesita que el animal a experimentar este entrenado, obteniendo así resultados confiables de los niveles de conducta basal (Polanco, 2011, pp 1-8).

1.2.10.2. Modelos de respuestas no condicionadas

Se mide la respuesta emitida por parte del animal experimentado frente a eventos nuevos o estresantes. En este se determina el comportamiento del animal en los distintos equipos, es decir cómo reacciona ante la luz, oscuridad, campos abiertos, cerrados, entre otros. Estas pruebas intentan mantener el microambiente del animal, como la comida y el agua, no se necesita de entrenamiento y no se someten a choques eléctricos, una de las ventajas para su uso es que poseen cierta validez ecológica por ser una prueba rápida, sencilla y económica.

Las pruebas de ansiedad poseen sensibilidad bidireccional, además no se requiere de largos procedimientos (Polanco, 2011, p. 9).

- **Laberinto elevado en cruz:** Ha sido utilizado para medir el comportamiento espontáneo del roedor, creando un ambiente de aproximación y evitación. El LCE contiene dos brazos abiertos y dos brazos cerrados y se evalúa el tiempo y la frecuencia de entradas a ellos. Además, se mide el “*head-deeping*” que consiste en asomarse por debajo de los brazos abiertos, la postura de estiramiento, exploración, locomoción y acicalamiento son indicadores del nivel de ansiedad y el nivel de evaluación sobre la exploración en un ambiente desconocido. Como se mencionó, en esta prueba el animal tiene el conflicto entre la evitación y el acercamiento, ya que el animal evita espacios abiertos donde, de acuerdo con la etología del roedor, hay mayor posibilidad de depredación, sin embargo, su conducta exploratoria lo motiva a recorrer los brazos abiertos. El laberinto en cruz elevado ha sido ampliamente utilizado por sus ventajas en cuanto a la facilidad de la aplicación de la prueba, ya que en general se trata de una prueba simple que no requiere entrenamiento del animal (Gallegos y Castillo, 2015, pp. 12-15).

- **Campo claro-oscuro:** Es una de las pruebas más utilizadas para medir la ansiedad como el comportamiento de los ratones. La prueba se basa en la aversión natural de los ratones a las zonas muy iluminadas y en su comportamiento espontáneo de exploración en ambientes nuevos. La prueba es sensible al tratamiento con medicamentos ansiolíticos. El aparato posee dos compartimentos, el cuarto claro y el oscuro. Los ratones se les permiten moverse libremente entre los dos compartimentos (Takao y Miyakawa, 2006, pp. 11-15).
- **Campo abierto:** la prueba consiste en colocar al roedor de manera individual en una caja de acrílico. En este equipo se somete al animal a un ambiente inexplorado del cual no puede salir debido a la presencia de paredes que se lo imposibilitan. La prueba involucra la exposición del animal a una situación estresante (Pérez y González , 2015, pp. 6-8).

Durante este período, se evalúa la ansiedad, locomoción, elevaciones, defecaciones y tiempos que permanecen en el centro, interior, laterales y esquinas del equipo (Psicología Eficaz, 2018, p. 3).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

Se realizó la evaluación de la actividad ansiolítica del extracto hidroalcohólico de las hojas de toronjil (*Melissa officinalis*) en ratones (*Mus musculus*), mediante la preparación del extracto en concentraciones de 25ppm, 100ppm y 200ppm. Para lo cual se utilizó los equipos de Laberinto cruz elevado, campo claro-oscuro y campo abierto.

2.1. Lugar de investigación

El control de calidad de la planta y la obtención del extracto hidroalcohólico de la especie vegetal se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales. La evaluación de la actividad ansiolítica se realizó en el bioterio de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2. Identificación de material vegetal

La identificación de *Melissa officinalis*, se realizó mediante la recolección del material vegetal y se procedió al prensado de la misma. Las muestras fueron identificadas por el curador José Homero Vargas López PhD. en el Herbario Misael Acosta Solís de la Universidad Técnica de Ambato (AMAS).

2.3. Recolección de material vegetal

Las muestras vegetales de *Melissa officinalis* se recolectaron en la Región Sierra, Provincia de Tungurahua, cantón Ambato, parroquia Pilahuín, en el mes de octubre 2018. Sus coordenadas geográficas con el GPS son: una longitud de 78.7300 ° O y una latitud de 1.3014 ° S.

2.4. Material vegetal

Hojas de Toronjil (*Melissa officinalis*).

2.5. Material biológico

Para la evaluación de la actividad ansiolítica se utilizaron Ratonos (*Mus musculus*), los mismos que fueron obtenidos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Guayaquil.

2.5.1. Descripción

- **Edad:** 2-3 meses
- **Sexo:** Hembras
- **Peso:** 25-30 g.
- **Alimentación:** 5 g de balanceado por cada ratón y agua clorada.
- **Cama:** Tamo de arroz esterilizado.
- **Iluminación:** 12 horas con luz y 12 horas en la oscuridad.

2.6. Materiales, equipos y reactivos

Tabla 1-2: Listado de materiales, equipos y reactivos utilizados.

SECADO Y TRITURADO DE LA PLANTA		
MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS
Espátula Papel aluminio	Molino Arthur H. thomas C. O Estufa Memmert SNB400	
CONTROL DE CALIDAD DEL MATERIAL VEGETAL		
MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS
Crisol de porcelana Espátula Cápsula Pinza para cápsula Reverbero Vidrio reloj Vaso de precipitación Pipeta graduada Papel filtro libre de cenizas Embudo Trípode	Balanza analítica Estufa RedLine by Binder Desecador Mufla IVYMEN – 1100 °C	Ácido clorhídrico 10 % Nitrato de plata Agua destilada
TAMIZAJE FITOQUÍMICO		
MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS

Frasco color ámbar 1000ml. Probeta 100mL Gradilla Tubos de ensayo Espátula Papel aluminio Pipeta graduada de 1ml, 5ml y 10ml. Reverbero Vaso de precipitación 250ml y 600mL Pinza para tubos Papel filtro Embudo Capilar Trípode Pera de succión	Balanza analítica Radwag Sorbona Cámara UV Chromato-VUE	Éter etílico Alcohol al 96% Agua destilada Colorante Sudan III Ácido clorhídrico 1% Ácido clorhídrico concentrado Dragendorff Cloruro de sodio en polvo Mayer Wagner Baljet Cloroformo Hidróxido de sodio Alcohol amílico Anhídrido acético Ácido sulfúrico concentrado Fehling solución A y B Tricloruro Férrico 5%. Acetato de sodio Magnesio metálico Carbonato de sodio
CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO		
MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS
Vaso de precipitación 25mL, 10mL y 600mL. Piseta Pipeta graduada de 5mL Picnómetro Cápsula de porcelana Pinza para cápsula	pH metro Accumet refractómetro Estufa Memmert SNB400	Alcohol etílico al 70% Agua destilada
OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CONCENTRADO		
MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS
Balón esmerilado 500mL Frasco ámbar 500mL Papel aluminio Papel filtro Espátula Probeta 250ml.	Refrigerador Rotavapor Buchi Sonicador Branson	Alcohol etílico al 70% Agua destilada.
ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES Y FLAVONOIDES		
MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS
Pipetas graduadas 1mL, 5mL y 10 mL. Balones aforados de 25mL, 10mL y 250 mL. Espátula Pizeta Pipetas automáticas Puntas amarillas y azules para pipetas automáticas. Tubos de ensayo Gradillas para tubos de ensayo Vasos de precipitación Papel aluminio Pera de succión	Balanza analítica Radwag Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolución 220 Agitador vórtex Cronómetro	Ácido gálico Agua destilada Alcohol etílico 70% Reactivo de Folin–Ciocalteu Carbonato de sodio al 7,5 % Quercetina Nitrato de sodio 5% Cloruro de aluminio 10% Hidróxido de sodio 1M

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA		
MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS
Cajas de plástico Rejillas Bebederos Frasco ámbar 50 mL Jeringuilla 1mL Cánula	Balanza analítica Radwag D-VIEWCAM D-LINK	Propilenglicol Clonazepam 2.5 mg/mL Vaselina

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

2.7. Técnicas y Métodos

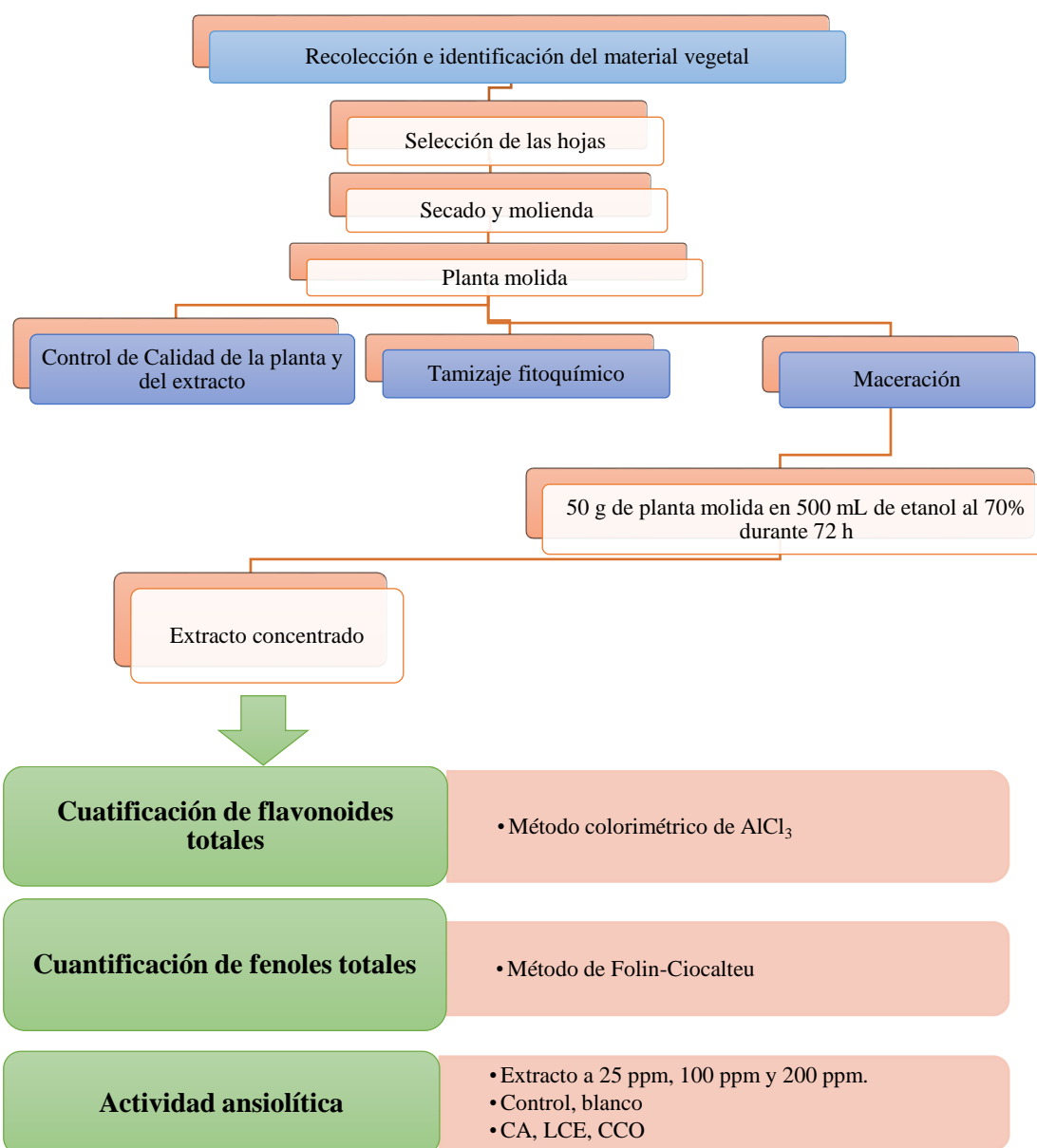


Figura 1-2: Metodología realizada para la evaluación de la actividad ansiolítica

Realizado por: Yajayra Medina, 2019.

2.7.1. *Recolección, lavado y secado del material vegetal*

Se recolectó las Hojas de Toronjil (*Melissa officinalis*) verificando que la especie vegetal presente buen estado, con superficies íntegras y frescas. Las hojas se lavaron y se secaron a 40°C en una estufa por aproximadamente 5 horas. Posteriormente, se procedió a la molienda y almacenado de la planta en una funda ziploc para protegerla de la humedad.

2.7.2. *Parámetros de control de calidad aplicados a la droga cruda*

Las pruebas se efectuaron por triplicado para verificar que los resultados sean confiables, eficaces y seguros, siguiendo las normas requeridas (NORMAS RAMALES, 1992, pp. 1-12).

2.7.2.1. *Determinación del contenido de humedad*

El ensayo determina la cantidad de agua que presenta el material vegetal, ya que el exceso de humedad puede ser el causante de la degradación vegetal y crecimiento microbiano.

Procedimiento: Se pesó 3 g de material vegetal triturado y se colocó en una cápsula de porcelana previamente tarada, posteriormente se colocó por 3 horas en la estufa a 105°C. Trascorrido ese tiempo se colocó en el desecador y se pesó hasta valores constante (Miranda, 2002, p. 10).

Expresión de resultados:

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

Donde:

H= % de pérdida en peso por desecación.

M= peso de cápsula vacía.

M₁= peso de cápsula con la muestra de la droga desecada.

M₂= peso de la cápsula con la droga.

2.7.2.2. *Determinación de cenizas totales*

Permite determinar la presencia de minerales en la muestra vegetal, al finalizar la ignición quedan los residuos inorgánicos adheridos a la planta como polvo, arena, tierra, etc.

Procedimiento: Se pesó 2.0 g de la muestra pulverizada en un crisol previamente tarado y se carbonizó la planta en un reverbero hasta eliminación de gases, posteriormente se coloca en la mufla a temperatura de 700 °C por 2 horas. Una vez transcurrido ese periodo se deja enfriar el crisol en el desecador para luego pesar. Repetir el procedimiento hasta peso constante (Miranda, 2002, p. 9).

Expresión de resultados:

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

Donde:

C = porcentaje de cenizas totales

M = peso del crisol vacío (g)

M₁ = peso del crisol con la muestra vegetal (g)

M₂ = peso del crisol con la ceniza (g)

100 = Factor matemático para los cálculos.

2.7.2.3. *Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico*

Permite determinar la presencia de sílice como la arena y tierra silíceas, que son el resultado de la ebullición de las cenizas totales con ácido clorhídrico al 10%.

Procedimiento: Una vez obtenido las cenizas totales, se añadió 3mL de ácido clorhídrico al 10%, posteriormente se cubrió con un vidrio reloj el crisol y se calentó sobre un baño de agua hirviendo durante 10 min. Se procede a lavar con 5mL de agua caliente el vidrio reloj y se le adiciona al contenido del crisol. Con un papel filtro se filtró y lavó el contenido hasta eliminación de cloruros. El filtrado con el residuo se coloca en el crisol y se carboniza en el reverbero, para luego incinerar en la mufla a 700°C durante 2h, colocar en el desecador y pesar hasta masa constante (Miranda, 2002, p. 9).

Expresión de resultados:

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

Donde:

B= porcentaje cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

M= peso del crisol vacío.

M₁= peso del crisol con la muestra de ensayo.

M₂= masa del crisol con la porción de cenizas de ácido clorhídrico.

100= factor matemático.

2.7.2.4. *Determinación de cenizas solubles en agua*

Ayuda determinar la presencia de material orgánico en las cenizas totales.

Procedimiento: Se añadió 20 mL de agua destilada a las cenizas totales y se hirvió por aproximadamente 5 min. Se filtró la solución con papel filtro y se procedió a transferir en el crisol, se carbonizó en el reverbero y luego se incineró en una mufla a 700°C, durante 2 h. Se colocó en una desecador y se pesó hasta obtener peso constante (Miranda, 2002, p. 9).

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

Donde:

Ca= (%) cenizas solubles en agua.

M₂ = peso crisol con las cenizas totales (g).

M₁ = peso crisol con la muestra del ensayo (g).

Ma = peso del crisol con las cenizas insolubles en agua (g).

M = peso crisol vacío (g).

2.7.3. *Tamizaje fitoquímico*

Es fundamental en investigación fitoquímica, que permite comprobar de manera cualitativa cuales son los principales compuestos presentes en la especie vegetal. Para así, posteriormente extraer los metabolitos de mayor importancia o los de interés por parte del investigador (Palacios, 2008, p. 18).

El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de los componentes de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de color y precipitación. Evalúa rápidamente con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del *screening* farmacológico (UNID, 2016, p. 5).

2.7.3.1. Elaboración de los extractos para el tamizaje fitoquímico.

Una vez obtenida las hojas desecadas y pulverizadas de Toronjil (*Melissa officinalis*), se pesó 40 g y se le añadió los siguientes solventes: éter etílico, alcohol etílico al 96% y agua destilada (Figura 2-2).

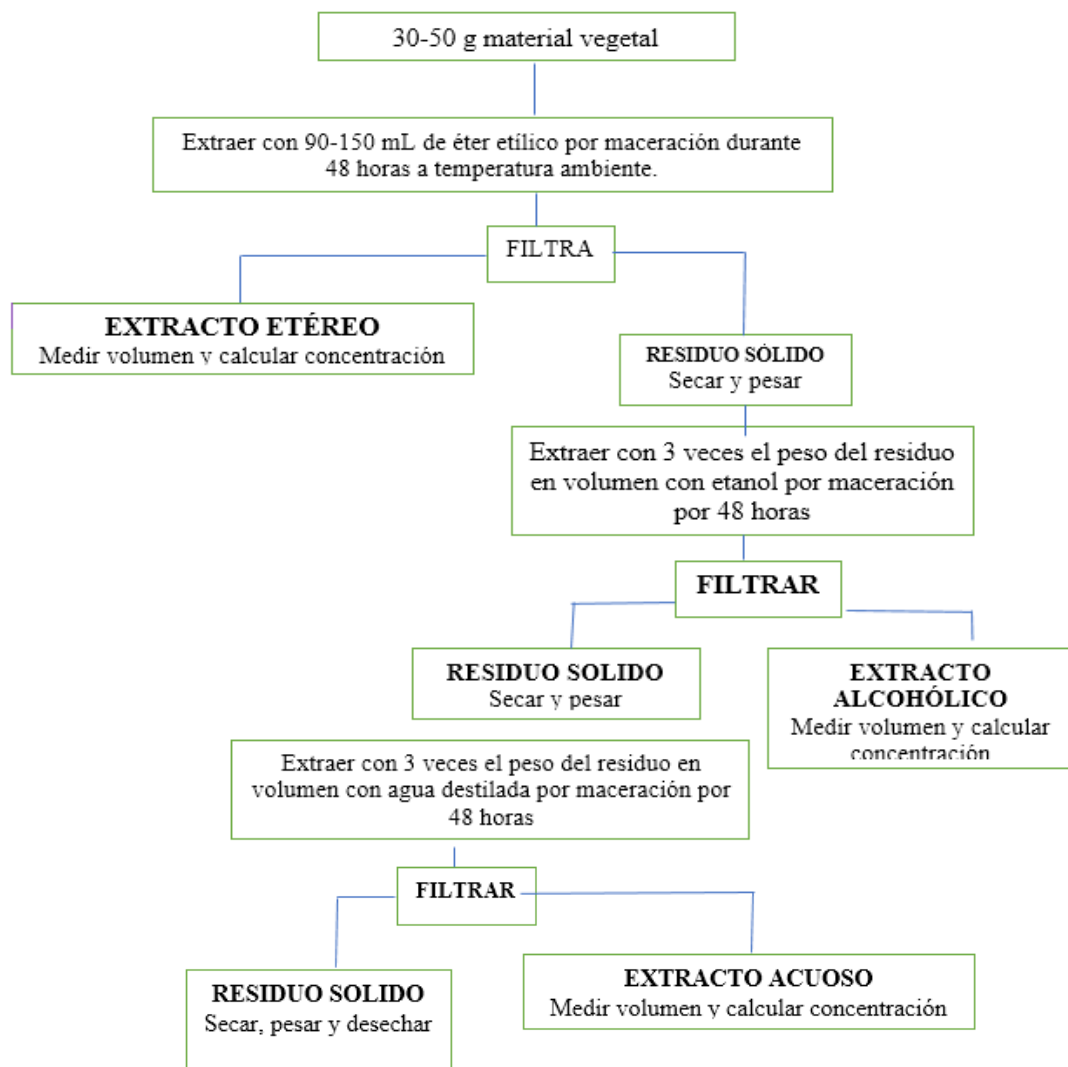


Figura 2-2: Esquema para el Tamizaje Fitoquímico.

Fuente: (Miranda, 2002).

Una vez obtenidos los extractos se determinaron cada uno de los ensayos respectivos para cada solvente. Los análisis se especifica a continuación:

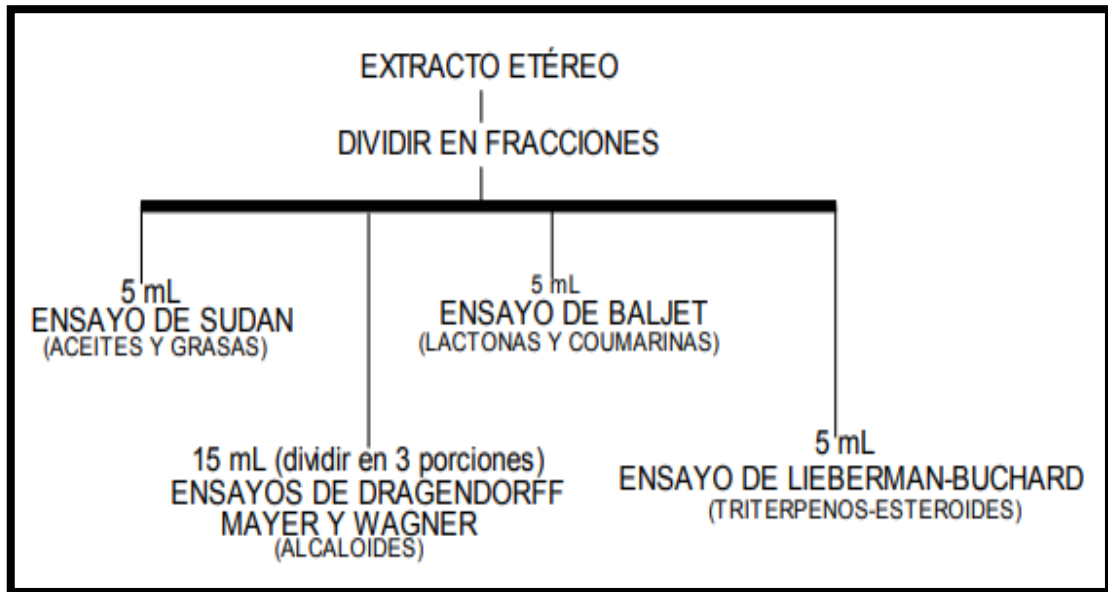


Figura 3-2: Esquema de ensayos del extracto etéreo
Fuente: (Miranda, 2002)

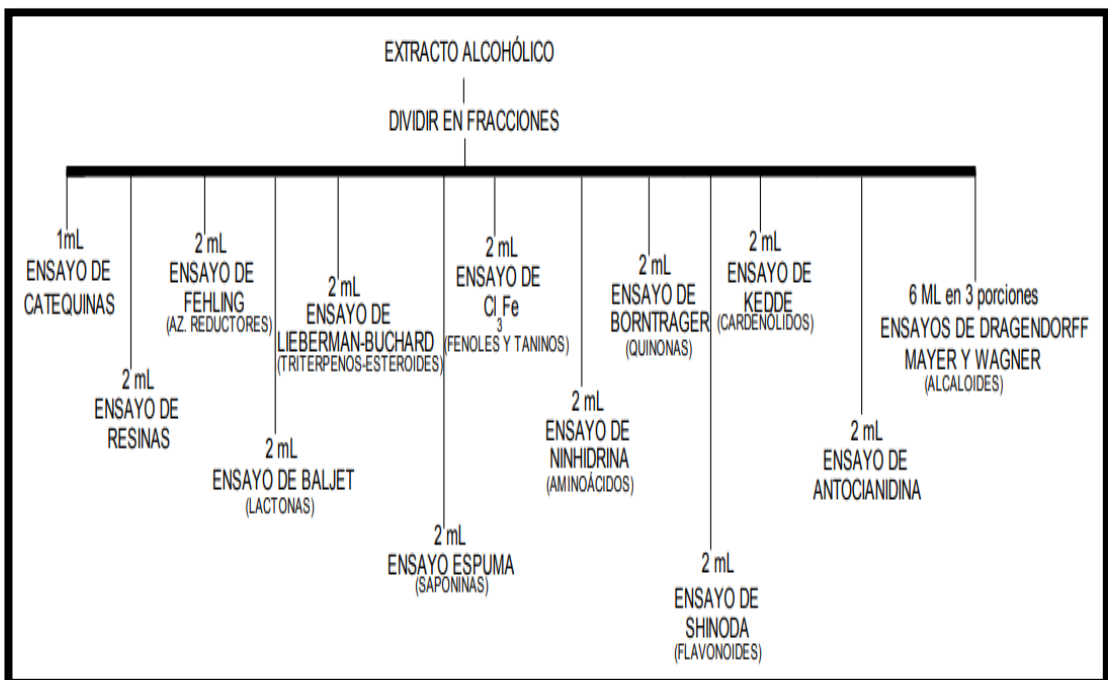


Figura 4-2: Esquema de ensayos del extracto alcohólico
Fuente: (Miranda, 2002)

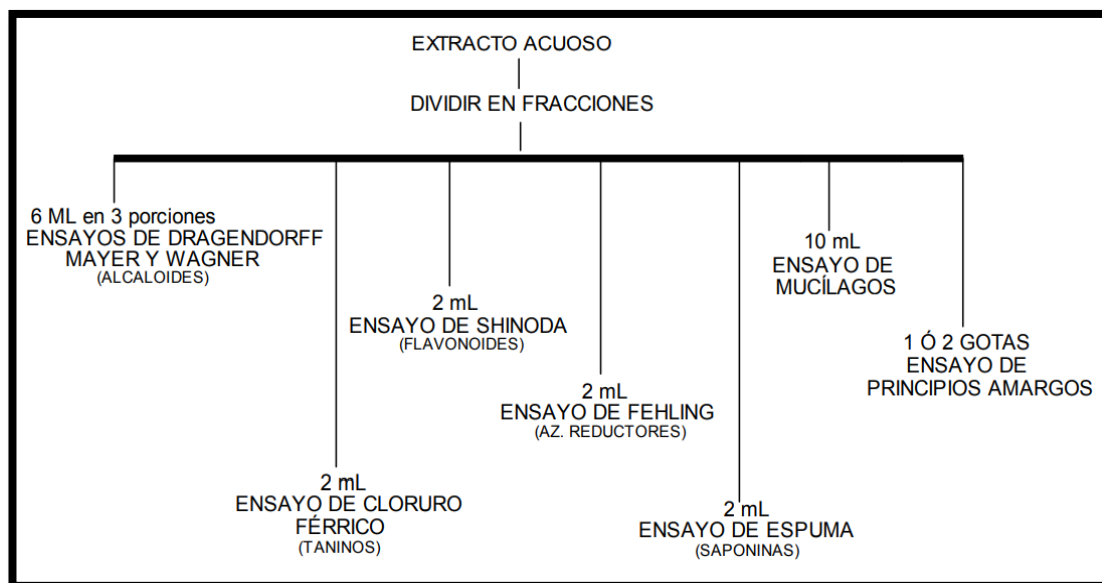


Figura 5-2: Esquema de ensayos del extracto acuoso

Fuente: (Miranda, 2002)

2.7.4. *Obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de TORONJIL (Melissa officinalis).*

Se pesó 50 g de la droga vegetal molida y se colocó en un frasco ámbar. Añadir 500 mL de alcohol etílico al 70 % y se lo dejó macerar por 72 horas. Finalmente se colocó en el sonicador por 15 minutos, se filtró el extracto y se colocó en un frasco color ámbar para su conservación. El cual fue utilizado en el control de calidad y concentrado del extracto.

2.7.5. *Control de calidad del Extracto Hidroalcohólico*

Los ensayos se realizaron para comprobar que el extracto hidroalcohólico sea seguro, eficaz y confiable (NORMAS RAMALES, 1992, pp. 1-12).

2.7.5.1. *Requisitos organolépticos*

Una vez filtrado el extracto hidroalcohólico, se efectuó distintos ensayos para garantizar su calidad. Se realizó los siguientes análisis: olor, color, aspecto y sabor.

2.7.5.2. *Determinación de densidad relativa*

La prueba se realiza con un picnómetro vacío y seco. Se pesa y se le añade el extracto hidroalcohólico, se mantuvo por 15 min a una temperatura de 25 °C, transcurrido el tiempo se pesa. Finalmente se llena el picnómetro con agua destilada a 25°C. se realizan los cálculos (Miranda, 2002, p. 52).

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

Donde:

M= Peso del picnómetro vacío.

M₁= Peso del picnómetro con muestra del extracto.

M₂= Peso del picnómetro con agua.

2.7.5.3. *Índice de refracción*

Con ayuda de un refractómetro previamente ajustado, se colocó una gota del extracto hidroalcohólico sobre el prisma y se enfocó la luz por medio del espejo. Finalmente se observó el resultado (Miranda, 2002, p. 52).

2.7.5.4. *Medición de pH*

Para el ensayo se usó un pHmetro digital.

2.7.5.5. *Determinación de sólidos totales*

Se colocó 5 mL del extracto en una cápsula tarada, se evaporó el disolvente en baño de agua. Colocar a una temperatura de 105 °C en la estufa, por 3 h. Enfriar en el desecador y pesar las muestras hasta valores constantes (Miranda, 2002, p. 54).

Expresión de resultados:

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

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 de la prueba.

2.7.6. Preparación del extracto hidroalcohólico concentrado

Se colocó el extracto hidroalcohólico en un balón esmerilado, este fue sometido al rotavapor a 50 °C, hasta eliminación de los disolventes y la obtención de un extracto concentrado. Finalmente se tapa el balón para evitar el contacto con la luz y se lo dejó en el refrigerador a -20 °C para su conservación y posterior utilización en la actividad ansiolítica.

2.7.6.1. Determinación de Flavonoides Totales

Para valorar la presencia de flavonoides totales, se colocó 1 ml de la solución estándar o problema en un tubo de ensayo libre de impurezas, luego se agregó 4 ml de agua destilada y 0,3 ml de solución de Nitrato de Sodio al 5%. Se colocó los tubos de ensayo en oscuridad durante 5 minutos. Posteriormente se adiciona 0,3 ml de Cloruro de Aluminio al 10%, vorteriza por 1 minuto y se dejar reposar en un lugar libre de luz por 5 minutos. Se colocó 2mL de Hidróxido de Sodio 1M, vorterizó 15 segundos más, y se observó la formación de un complejo rosado, esto se debe a la unión del aluminio a los compuestos fenólicos. Finalmente se dejó las muestras en oscuridad por 15 minutos y se realizó las lecturas a una longitud de onda de 510 nm en el espectrofotómetro.

2.7.6.2. Determinación de Fenoles Totales

Para la determinación de Fenoles Totales en un balón de aforo de 25 mL se colocó 250 µL de la solución del extracto, a continuación, se colocó 15 mL de agua destilada y 1,25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Por 30 segundos vorterizar y dejar reposar en oscuridad por 8 minutos. Se añadió 3,75 mL de solución de Carbonato de Sodio al 7.5%, se aforar con agua destilada y se vorterizó durante 5 segundos, se deja reposar en la oscuridad por 2 horas. Una vez transcurrido el tiempo se leen las absorbancias a una longitud de onda de 765 nm en el espectrofotómetro.

2.7.7. Actividad ansiolítica

La evaluación de la actividad ansiolítica se realizó *in vivo* en ratones hembras (*Mus musculus*), con peso aproximado de 25-30g y de 2-3 meses de edad, las especies animales se obtuvieron en ciudad de Guayaquil, en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI).

El estudio experimental se realizó en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, proporcionando a los animales de experimentación un macro y microambiente óptimo y adecuado. La habitación en la que se encontraban los ratones es un área iluminada, libre de ruido, con temperatura y ventilación apropiada para la ambientación del animal. Los ratones fueron agrupados de forma aleatoria en grupos de cinco, los mismos se colocaron en cajas con sus respectivas rejillas, además se les proporcionó un lecho con tamo esterilizado, agua clorada y alimentación. Los grupos de ratones fueron distribuidos de la siguiente manera (tabla 2-2).

Para la administración del extracto concentrado de *Melissa officinalis* se reconstituyó con propilenglicol al 15%, se administró las dosis que se muestran en la tabla 2-2. Para la evaluación de la actividad ansiolítica, se procedió a trasladar a un ratón de cada grupo por 30 minutos para su adaptación, transcurrido ese tiempo se procedió a la administración en cada uno de los ratones de 0,5 mL de cada uno de los tratamientos. Finalmente transcurrido los 30 minutos se realizó las pruebas de ansiedad, este procedimiento se realizó en cada uno de los equipos.

Tabla 2-2: Tratamientos, código, concentración y dosis para la evaluación de la actividad ansiolítica de *Melissa officinalis*.

Tratamientos	Código	Concentración	Dosis	Número de ratones
Propilenglicol	BLANCO	15%	0,5 mg/kg	5
Clonazepam	CONTROL	0,5 mg/kg	0,5 mg/kg	5
<i>Melissa officinalis</i> (Extracto concentrado)	D1-MO	25 mg/kg	0,5 mg/kg	5
	D2-MO	100 mg/kg	0,5 mg/kg	5
	D3-MO	200 mg/kg	0,5 mg/kg	5

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

Para la evaluación de la actividad ansiolítica se utilizó modelos de respuesta no condicionada, manejando los equipos electrónicos: cuarto claro-oscuro, campo abierto y laberinto cruz elevado. Los resultados obtenidos fueron emitidos por los programas: ITOPI que proporciona los resultados del cuarto claro-oscuro y laberinto cruz elevado, y el EMIS que procesa los datos del equipo de medición campo abierto.

2.7.7.1. *Equipo electrónico de medición “Cuarto Claro-Oscuro”.*

El equipo está elaborado con polipropileno de (44cm x 21cm x 21cm), posee dos cuartos, la sección clara y la oscura, estas se encuentran separadas por una pared, esta posee una pequeña entrada por el cual el roedor puede entrar o salir. Cuenta con un soporte, formado de un techo de madera y patas de aluminio, esta se encuentra cubierta con cortinas que impiden el paso de luz al equipo. Los videos son grabados con una cámara (D-View Cam), que se encuentra en la parte superior del equipo (Guerra, 2018, p. 55).



Figura 6-2: Equipo electrónico de medición “Cuarto Claro-Oscuro”
Realizado por: Yajayra Medina, 2019

El equipo posee un programa de procesamiento de imagen (ITOPI) donde se procesan los videos.

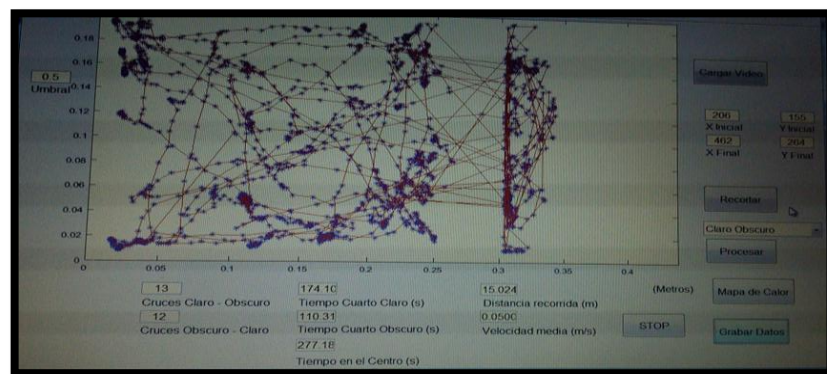


Figura 7-2: Aplicación ITOPI del “Cuarto Claro-Oscuro”

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

Parámetros a medir:

Tabla 3-2: Parámetros a medir del “Cuarto Claro-Oscuro”

Tiempo cuarto claro (Min)	Actividad ansiolítica, el animal se encuentra relajado.
Tiempo cuarto oscuro (Min)	Actividad ansiolítica, el animal se encuentra estresado, evita el contacto con la luz.
Tiempo de cruces (Min)	Actividad locomotora
Número de entradas cuarto claro	Mayor locomoción, a mayor número de entradas
Número de entradas cuarto oscuro	Mayor locomoción, a mayor número de entradas
Distancia recorrida (m/s)	Actividad locomotora, tiende a desplazarse más.
Velocidad media (s)	Actividad locomotora, tiende a moverse más.

Fuente: (Yancha, 2018, p. 24-27)

Realizado por: Yajayra Medina, 2019.

2.7.7.2. *Equipo electrónico de medición “laberinto elevado en cruz”.*

El equipo está fabricado en polipropileno, consta de brazos abiertos (30cm x 10cm) y dos brazos cerrados (30cm x 10cm x 20cm) opuestos entre sí de color negro, se encuentra conectado con una plataforma que está elevado a 38,5cm del suelo. Cuenta con un soporte, formado de un techo de madera y patas de aluminio, esta se encuentra cubierta con cortinas que impiden el paso de luz al equipo. Los videos fueron grabados con una cámara marca D-link, que se encontraba sujeta a la parte superior del soporte (Guerra, 2018, p. 56). El equipo se muestra en la Figura 13-2.

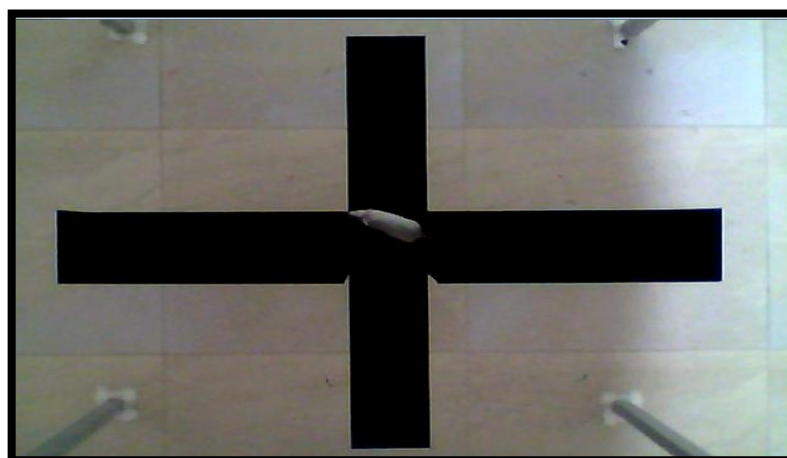


Figura 8-2: Equipo electrónico de medición “laberinto cruz elevado”

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

Los videos grabados en este equipo son procesados con el programa (ITOPi).

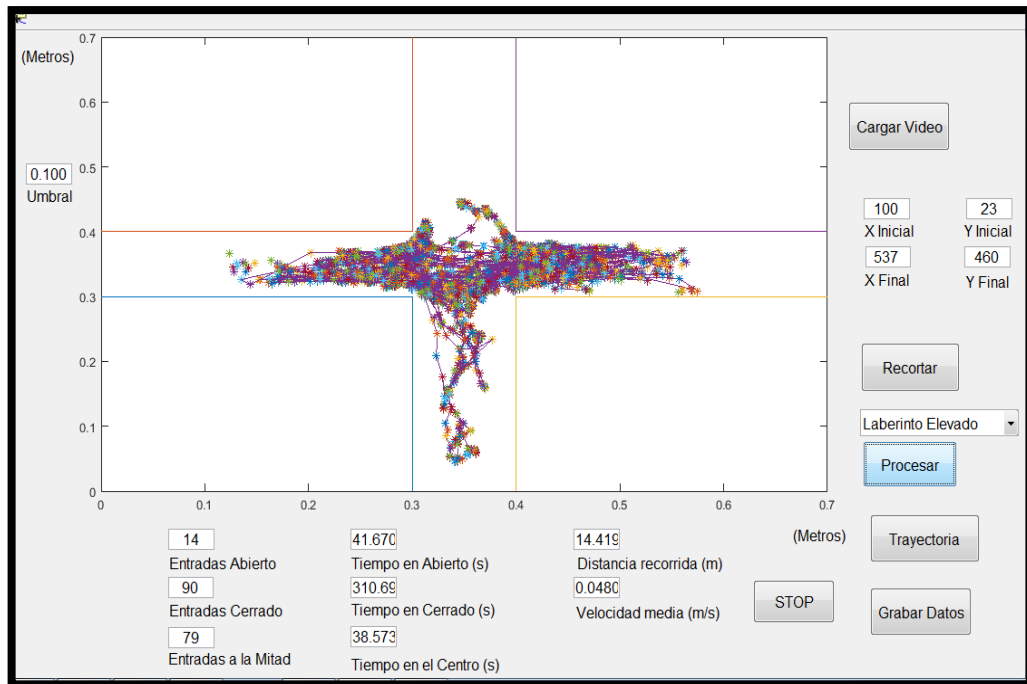


Figura 9-2: Aplicación ITOPI del “laberinto cruz elevado”

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

Parámetros a medir:

Tabla 4-2: Parámetros a medir en el equipo “laberinto cruz elevado”

Tiempo brazos abiertos	Actividad ansiolítica, el roedor se encuentra relajado.
Tiempo brazos cerrados	Determina la actividad ansiolítica, a mayor tiempo más estresado está el animal.
Tiempo en el centro	Actividad ansiolítica, el roedor se encuentra relajado.
Entradas brazos abiertos	Actividad locomotora, el animal está explorando.
Entradas brazos cerrados	Actividad locomotora, el animal está explorando.
Entradas al centro	Actividad locomotora, el animal está explorando.
Distancia recorrida	Actividad locomotora.
Velocidad media	Mejor locomoción a mayor desplazamiento.

Fuente: (Yancha, 2018, pp.24-27).

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

2.7.7.3. Equipo electrónico de medición “Campo Abierto”.

El aparato electrónico posee una caja de polipropileno (68 x 68 cm y paredes de 45 cm de altura). Al igual que los anteriores equipos está cubierta por cortinas que impiden el paso de la luz, y tiene incorporado una cámara D-Link, en la parte superior del equipo (Yancha, 2018, pp. 50-60).

El aparato se muestra en la Figura 13-2.



Figura 10-2: Equipo electrónico de medición “Campo Abierto”
Realizado por: Yajayra Medina, 2019

Cuenta con una aplicación de procesamiento de imagen (EMIS).

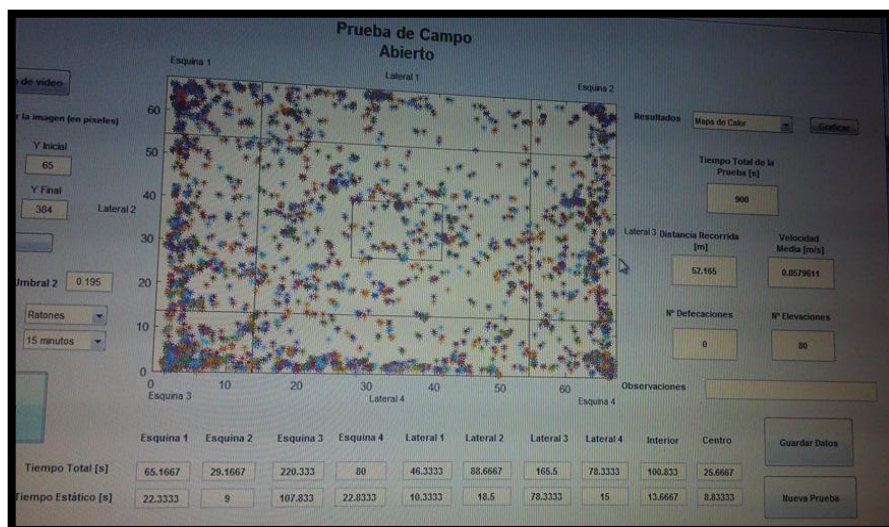


Figura 11-2: Aplicación EMIS del “Campo Abierto”
Realizado por: Yajayra Medina, 2019

Parámetros a medir:

Tabla 5-2: Parámetros a medir en el equipo “Campo Abierto”

Tiempo en el centro	Actividad ansiolítica, el roedor se encuentra relajado.
Tiempo en el intermedio	Actividad ansiolítica, el roedor se encuentra relajado.
Tiempo en los laterales	Actividad ansiolítica, el roedor se encuentra ansioso.
Tiempo en las esquinas	Actividad ansiolítica, el roedor se encuentra estresado.
Defecaciones	Actividad locomotora, mayor número de defecaciones más estrés.
Elevaciones	Actividad locomotora, mayor número de defecaciones más estrés.
Distancia recorrida	Actividad locomotora, mayor número de defecaciones más relajado
Velocidad media	Actividad locomotora, mayor número de defecaciones más relajado

Fuente: (Yancha, 2018 pp. 24-27).

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

2.7.8. Procedimiento de utilización de equipos

Detalles de la realización de los ensayos:

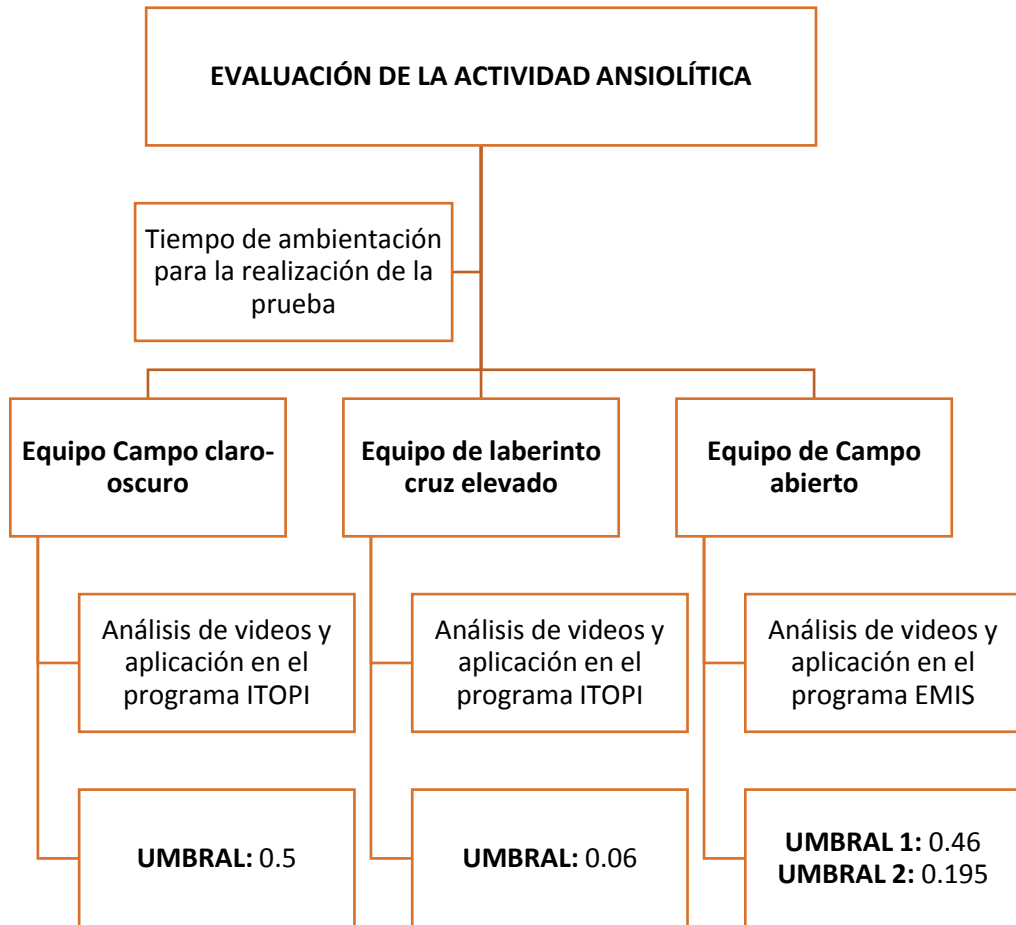


Figura 12-2: Flujograma para la evaluación la actividad ansiolítica.

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

El procedimiento se basó en los POES especificados para cada equipo, antes de la realización de ensayo se armó el equipo y con alcohol al 10% se desinfectó las áreas antes de cada prueba. Para grabar cada una de las pruebas se conecta la cámara mediante una red wifi en el computador, posteriormente se coloca a cada uno de los ratones, se evaluó el comportamiento durante 5 minutos en el equipo claro-oscuro y en el campo “Laberinto cruz elevado”, concluidas las pruebas se desconecta la cámara, se desinfecta y se guardan los equipos. Los videos obtenidos son procesados con los programas, y finalmente los resultados obtenidos son copiados al Excel para sus análisis.

2.7.9. *Análisis estadístico*

El análisis se realizó en el programa IBM SPSS Statistics 25, para proceder al análisis de la actividad ansiolítica, se analizan los resultados y deben ser normales, para los cuales se aplican pruebas paramétricas como homogeneidad de varianzas y distribución normal. Se realiza la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si existe una distribución normal en nuestros resultados, se utiliza esta prueba ya que tiene menos de 50 datos y prueba de Levene para establecer la igualdad de varianzas, los datos deben ser mayores al nivel de significancia 0,01, para posteriormente ser aplicados en la prueba de ANOVA.

Se realizó el análisis ANOVA (prueba paramétrica de hipótesis) estableciendo que:

- **Hipótesis nula (H_0):** Las medias de los parámetros en los diferentes tratamientos son iguales.
- **Hipótesis de alternativa (H_a):** Existe al menos una pareja de medias de parámetros que son diferentes.

Se realizó un análisis con el test ANOVA una vez que los 5 tratamientos, en los cuales la mayoría de los datos fueron menores al nivel de significancia, es decir existe diferencias significativas en cada uno de los parámetros analizados. Para establecer cuáles son los parámetros con medias diferentes, se aplicó el test post hoc Tukey.

En el test post hoc Tukey, se determinó la formación de subconjuntos homogéneos en los parámetros, se analizaron las probabilidades y estableció que para concluir se va a tomar en cuenta el subconjunto con mayor probabilidad.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Ensayos de Control de calidad de la Droga Cruda

Se realizó el control de calidad de las hojas de Toronjil (*Melissa officinalis*). Resultados por triplicado.

Tabla 1-3: Resultados obtenidos del Control de Calidad de droga cruda de *Melissa officinalis*.

PARÁMETRO	Hojas de <i>Melissa officinalis</i>	Límites de referencia	Normativa
Humedad (%)	9,08± 0,13	Hasta 14%	USP# 35
Cenizas totales (%)	7,62±0,12	Hasta 12%	USP# 35
Cenizas solubles en agua (%)	3,41±0,14	Hasta 7%	USP# 35
Cenizas insolubles en HCl (%)	0,71±0,02	Hasta 5%	USP# 35

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

La cantidad de humedad presente en las hojas de *Melissa officinalis* fue de 9,08 %, como estima la USP#35 un máximo de 14%, los valores se encuentran dentro de los parámetros establecidos, esta determinación contribuye a evaluar la cantidad de agua que se encuentra presente en el material vegetal. Indica el correcto proceso de secado y almacenamiento de las hojas de la planta. La presencia de exceso de humedad puede ser el causante de la degradación vegetal y crecimiento microbiano. Para garantizar que gran parte de humedad sea eliminada de la planta es recomendable realizar un secado artificial ya que proporciona un mayor rendimiento en la concentración de principios activos y mayor conservación de la droga durante el almacenamiento (Guillén y Sarmiento, 2011, p. 21).

La determinación de cenizas totales ayuda a determinar la cantidad del material sobrante después de la ignición, ya sean cenizas fisiológicas (tejidos de la planta) o cenizas no fisiológicas (materia extraña adherida a la superficie de la planta). El valor encontrado de cenizas totales en esta especie fue de 7,62%, encontrándose dentro de los parámetros establecidos por la USP #35 (World Health Organization, 1998, p. 10).

Los resultados de los análisis de cenizas solubles en agua son de 3,41 %, estos valores se encuentran dentro de los límites establecidos para materiales vegetales de la USP #35, esta prueba ayuda a determinar la presencia de metales pesados en el material vegetal.

El contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico, determina la cantidad de sílice, un valor elevado de estas cenizas son un indicativo de que la droga vegetal está contaminada con tierra silíceo o arena, el valor encontrado en las hojas de *Melissa officinalis* es de 0,71 %, se encuentran dentro de los intervalos permisibles por la USP #35.

3.2. Tamizaje Fitoquímico

Tabla 2-3: Resultados del tamizaje fitoquímico de los diferentes extractos de las hojas de Toronjil (*Melissa officinalis*)

ENSAYO	METABOLITOS IDENTIFICADO	EXTRAC ETÉREO	EXTRACTO ETANÓLICO	EXTRAC. ACUOSO
SUDAN	Compuestos grasos	(+)	(NA)	(NA)
DRAGENDORFF	Alcaloides	(+++)	(+++)	(+++)
MAYER	Alcaloides	(-)	(-)	(-)
WAGNER	Alcaloides	(+++)	(+++)	(+++)
BALJET	Compuestos lactónicos (Cumarinas)	(-)	(-)	(NA)
BORNTRAGER	Quinonas	(NA)	(+++)	(NA)
LIEBERMANN-BURCHARD	Triterpenos y esteroides	(+++)	(+++)	(NA)
CATEQUINAS	Catequinas	(NA)	(+)	(NA)
RESINAS	Resinas	(NA)	(-)	(NA)
FEHLING	Azúcares reductores	(NA)	(++)	(++)
ESPUMA	Saponinas	(NA)	(-)	(+)
TRICLORURO FÉRRICO	Fenoles y taninos	(NA)	(++)	(++)
SHINODA	Flavonoides	(NA)	(+)	(++)

ANTOCIANIDINA	Flavonoides	(NA)	(+)	(NA)
MUCILAGOS	Polisacáridos	(NA)	(NA)	(+)
PRINCIPIOS AMARGOS Y ASTRINGENTE	Principios amargos	(NA)	(NA)	Amargo

(-) Negativo, (+) Baja evidencia, (++) Evidencia, (++++) Alta evidencia, (NA) No aplica

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

En la Tabla 2-3, se observan los resultados del tamizaje fitoquímico de las hojas de *Melissa officinalis*, realizados sobre los tres extractos: Etéreo, alcohólico y acuoso. Siendo Compuestos grasos, alcaloides, quinonas, triterpenos, esteroides, catequinas, azúcares reductores, saponinas, fenoles, taninos, flavonoides, polisacáridos y principios amargos los identificados.

Shakeri y colaboradores (2016) recopilaron información acerca de los usos tradicionales, compuestos químicos y actividad biológica de *Melissa officinalis*, revelando la presencia de varios metabolitos, incluidos los terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos y triterpenos) y compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides y taninos). Los constituyentes activos de *M. officinalis* se caracterizan por ser compuestos volátiles (Geranial, neral, citronelal y geraniol), triterpenos (Ácido ursólico y oleanólico) y fenólicos (derivados del ácido cafeico, luteolina, naringina y hesperidina) (Shakeri y Sahebkar, 2016, pp. 23-25).

Celedonia, en el año 2018 realizó una investigación sobre la “Evaluación de la influencia de las proporciones de hojas de cedrón (*Aloysia citriodora*), toronjil (*Melissa officinalis*) y stevia (*Stevia rebaudiana Bertonii*) para la aceptabilidad de un filtrante mix”, identificando en las hojas la presencia de metabolitos como los: flavonoides, taninos, ácidos triterpénicos, saponinas, compuestos amargos. Además de aldehídos y alcoholes sesquiterpénicos: citral a y b, geraniol, linalol, citronelal (Celodonia, 2018, pp. 12-20).

Se observa la presencia de Alcaloides en los tres extractos, estos actúan principalmente sobre el sistema nervioso, presentan actividad alucinógena y simpaticomimética. Son utilizadas para disminuir los espasmos, calmando los dolores y secando las secreciones corporales (Echegaray et al., 2011, pp. 42-45).

Mediante el ensayo de Borntrager se determinó la presencia de quinonas en el extracto alcohólico, las plantas que contienen estos compuestos son especies vegetales que pueden comportarse como laxantes o como purgantes en dependencia de las dosis administradas.

En los extractos alcohólicos y acuosos se encontraron fenoles, taninos y flavonoides, los taninos tienen actividades de contracción de tejidos, compactándolos y aumentando su resistencia a las infecciones. Mientras que los fenoles que ejercen una acción antiséptica y reducen la inflamación y tiene un efecto irritante a nivel externo en la piel (Echegaray et al., 2011, pp. 45-46).

Finalmente, las catequinas presentan actividades antioxidantes, antiinflamatorios, antimicrobianos, anticancerígenos, actividades anti-VIH, anticoagulantes, inmunomoduladores, hepatoprotectoras, intertuberculares y antialérgicas (Shakeri y Sahebkar, 2016, p. 45).

Se observa la presencia de triterpenos esteroideos en el extracto etéreo y alcohólico, estudios han aislado los principales triterpenos de *M. officinalis*, que son los ácidos ursólicos y oleanólico. Estos compuestos tienen un amplio espectro de efectos biológicos que incluyen actividades antifúngicas, citotóxicas y hemolíticas (Shakeri y Sahebkar, 2016, p. 46)

Finalmente se observó en el extracto acuoso la presencia de mucílagos y principios amargos, los mucílagos actúan en el organismo recubriendo las membranas mucosas del aparato digestivo y de esta manera lo protegen de la acidez, la irritación y la inflamación. Los principios amargos proporcionan un sabor amargo y desagradable al extracto, pero estimulan las secreciones de las glándulas salivares y del sistema digestivo (Echegaray et al., 2011, p. 48).

3.3. Control de calidad de extracto hidroalcohólico de hojas de Toronjil (*Melissa officinalis*).

Tabla 3-3: Resultados obtenidos del Control de Calidad del extracto hidroalcohólico de hojas de Toronjil (*Melissa officinalis*).

EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE TORONJIL (<i>Melissa officinalis</i>)			
CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS		CARACTERÍSTICAS FÍSICO – QUÍMICO	
Olor	Alcohólico	Índice de refracción	1,34
Color	Verde intenso	pH	6,02
Aspecto	Traslúcido	Densidad relativa	0,89 g/mL
Sabor	Amargo ligeramente astringente	Sólidos totales (%)	2,14

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

En la tabla 3-3, se muestran los resultados del control de calidad del extracto hidroalcohólico de hojas de *Melissa officinalis* de acuerdo a las normas NRSP 312 en el apartado correspondiente a “Medicamentos de Origen Vegetal. Extractos fluidos y tinturas” (Chávez, 2002, p. 29).

Se determinó en el extracto hidroalcohólico las características organolépticas, presentando un olor alcohólico, color verde intenso, aspecto translúcido y con un sabor amargo ligeramente astringente, los resultados son coherentes con las características tanto de la droga vegetal otorgado por los principios amargos como del solvente empleado.

El índice de refracción del extracto hidroalcohólico fue de 1,34, que al comparar con el índice de refracción del agua (1,333) resulta ser mayor, lo cual indica la presencia de sustancias disueltas o solubles en el extracto analizado.

El pH del extracto fue de 6,02, siendo este un indicativo de que el extracto presenta características ácidas débiles, probablemente debidas a compuestos como: flavonoides, fenoles y taninos, saponinas, esteroides y Triterpenos (Rodríguez y Moran, 2008, p. 36).

Los valores de densidad relativa obtenidos son de 0,89 g/mL, comparando con la densidad relativa del solvente utilizado (alcohol etílico al 70%) que es de 0,81 g/mL, se observa que el valor del extracto es superior demostrando así que la solución presenta sustancias disueltas en el extracto.

El porcentaje de sólidos totales obtenido en el extracto hidroalcohólico de la droga vegetal es de 2,14 %, hay que tener presente que, a mayor cantidad de sólidos totales, existe mayor probabilidad de la presencia de metabolitos activos (Rodríguez y Moran, 2008, p. 37).

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

Para la realización del ensayo se utilizó el método Folin-Ciocalteu, cuyo estándar es el ácido gálico. Curva de calibración aplicada: $y = 0,000795x + 0,013$ y R^2 de 0,999.

Tabla 4-3: Resultados de la cuantificación de Fenoles Totales

FENOLES TOTALES			
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE TORONJIL (<i>Melissa officinalis</i>)	Concentración	mg Equivalentes de Ácido Gálico/g de extracto seco	G Equivalentes de Ácido Gálico/100g de extracto seco (%EQFT)
RESULTADO	200ppm	34,5 ± 0.01	3,45 %

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

Se observa el resultado de Fenoles Totales (Tabla 4-3), del extracto concentrado de *Melissa officinalis* obteniendo un valor de 34,5 mg Equivalentes de Ácido Gálico/g de extracto seco y de 3,45 % G Equivalentes de Ácido Gálico/100g de extracto seco (%EQFT), a una a una concentración de 200 ppm. Los compuestos fenólicos presentan actividad antioxidante, efectos protectores y terapéuticos fundamentales para prevenir enfermedades.

Spiridon y colaboradores (2012) realizaron el estudio de la capacidad antioxidante y contenido fenólico total del orégano (*Origanum vulgare*), lavanda (*Lavandula angustifolia*) y limón bálamo (*Melissa officinalis*) de Rumania, mediante la cuantificación basada en el análisis HPLC-UV se comprobó que en los extractos de *Melissa officinalis* existe la presencia de fenoles totales con un valor de $54,9 \pm 2.14$ mg ácido Gálico/g, al compararlo con los valores obtenidos del extracto concentrado de Toronjil (*Melissa officinalis*), se observa que la del presente estudio presenta un contenido de fenoles menor (Spiridon et al., 2011, p. 42).

Atanassova y colaboradores (2011), realizaron un análisis del contenido de flavonoides totales, fenoles totales, capacidad antioxidante y contaminantes biológicos en hierbas medicinales, determinaron con el ensayo de Folin-Ciocalteu el contenido fenólico total de las hierbas secas, que es de 48,86 mg GAE / 100 g, con ácido gálico como estándar, haciendo una comparación con los resultados obtenidos de la planta analizada los valores son mayores (Atanassova et al., 2011, p. 58).

3.5. Cuantificación de Flavonoides Totales

Para la determinación de flavonoides se aplicó el método Colorimétrico de Tricloruro Férrico, cuyo patrón de referencia es la quercetina. La curva de calibración utilizada fue: $y = 0,00197 + 0,0056x$ y R^2 de 0,999.

Tabla 5-3: Resultados de la Cuantificación de Flavonoides

FLAVONOIDES TOTALES			
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE TORONJIL (<i>Melissa officinalis</i>)	Concentración	mg Equivalentes de Quercetina/g de extracto seco	G Equivalentes de Quercetina/100g de extracto seco (%EQFT)
RESULTADO	200ppm	30,483± 0,28	3,05%

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

Se observa en la Tabla 5-3, el resultado de Flavonoides en el extracto de *Melissa officinalis* a una concentración de 200 ppm dando un valor de 30,483mg Equivalentes de Quercetina/g de extracto seco y de 3,05 % G Equivalentes de Quercetina/100g de extracto seco (%EQFT). La presencia de flavonoides es muy importante en las plantas estudiadas ya que presentan propiedades antiinflamatorias, actividad ansiolítica, eliminación de radicales libres e inhibición de la enzimas hidrolíticas y oxidativas. Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en *Melissa officinalis*, estando presente flavonas, flavonoles, flavonol glucósido entre otros (Atanassova et al., 2011, p. 59).

Spiridon y colaboradores en el 2012, realizaron una investigación de la capacidad antioxidante y contenido fenólico total del orégano (*Origanum vulgare*), lavanda (*Lavandula angustifolia*) y limón balsámico (*Melissa officinalis*) de Rumania, comprobando que el extracto de *Melissa officinalis* presenta una cantidad de flavonoides de $25,8 \pm 6,25$ mg quercetina/g, realizando una comparación con los valores obtenidos con el extracto concentrado de *Melissa officinalis* este es menor (Spiridon et al., 2011, p. 32).

Atanassova y colaboradores (2011), determinaron el contenido de flavonoides totales, fenoles totales, capacidad antioxidante y contaminantes biológicos en hierbas medicinales, el estudio fue realizado mediante el ensayo colorimétrico de cloruro de aluminio, en el extracto de metanol del bálsamo de limón, presentando un valor de 45,06 mg CE / 100, con la solución patrón de quercetina, siendo este resultado mayor al extracto concentrado de *Melissa officinalis* (Atanassova et al., 2011, p. 60).

3.6. Actividad ansiolítica *in vivo*

3.6.1. Equipo electrónico de medición campo claro-oscuro

3.6.1.1. Tiempo en el cuarto claro y cuarto oscuro

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

Grupos	Tiempo en Cuarto Claro (Minutos)	Tiempo en el Cuarto Oscuro (Minutos)
Blanco	2,34	1,52
Control	4,27	0,40
D1-MO	2,85	1,21
D2-MO	3,52	0,73
D3-MO	3,81	0,53

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

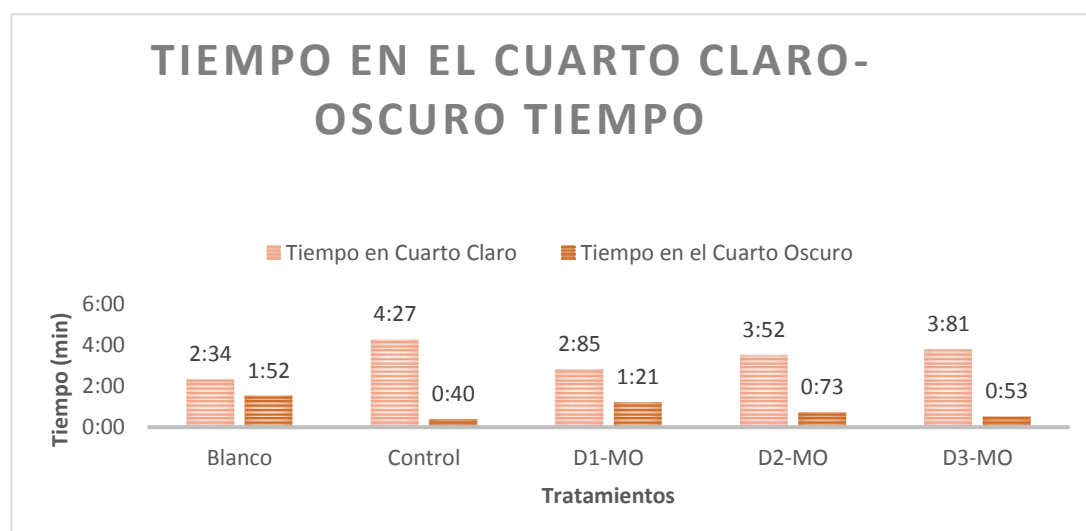


Gráfico 1-3: Tiempos de duración en Cuarto Claro y Oscuro obtenidos en los ensayos a diferentes concentraciones.

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

Se puede observar en el Gráfico 1-3, el tiempo que permanece cada uno de los roedores en el cuarto claro-oscuro, se puede apreciar que en el cuarto claro el control con 4,27 minutos tiene mayor tiempo de permanencia, seguido de los tratamientos D2-MO, D3-MO, los resultados indican que después de la administración de estos tratamientos los niveles de ansiedad disminuyen, debido a que el ratón permanece mayor tiempo en el cuarto claro. En el cuarto oscuro se puede observar que los valores van desde 1,52 minutos del Blanco y en la dosis D1-MO con 1.21 minutos.

Tabla 7-3: Test ANOVA para tiempos en cuarto claro y oscuro

ANOVA					
TIEMPO CUARTO CLARO					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	11,761	4	2,940	44,742	,000
Dentro de grupos	1,314	20	,066		
Total	13,076	24			
TIEMPO CUARTO OSCURO					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4,487	4	1,122	48,904	,000
Dentro de grupos	,459	20	,023		
Total	4,946	24			

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

Los p-valores obtenidos en el test ANOVA (Tabla 7-3), para las medias de los tiempos en el cuarto claro y oscuro son menores que el nivel de significancia ($p > 0,01$), lo que significa que existen diferencias significativas en los tiempos en cada uno de los compartimentos.

En la Tabla 8-3 se puede observar el test post-hoc HSD Tukey. Se forman tres sub grupos homogéneos en el tiempo de permanencia en el cuarto claro, el que presenta mayor probabilidad es el subconjunto formado por el control y D3-MO, indicando que la D3-MO es la que presentaría actividad ansiolítica en relación con las demás dosis por su mayor permanencia en el cuarto claro. También se puede observar la formación de dos subconjuntos homogéneos en el tiempo en el cuarto oscuro, está formado las dosis D2-MO y D3-MO con el Control y la dosis D1-MO con el Blanco. El subconjunto que presenta mayor probabilidad es el que se encuentra formado por el blanco con la D1-MO, es decir el D1-MO no presenta diferencia significativa con el blanco (Propilenglicol 15%), siendo estos los que permanecen más tiempo en el compartimento oscuro, demostrándose que esta dosis al encontrarse con el blanco no presenta actividad ansiolítica.

Según el análisis estadístico se puede determinar que las dosis que posiblemente poseen actividad ansiolítica en este equipo son las dosis D2-MO y D3-MO, ya que se agrupan con el Control, hay que tener presente que las condiciones del bioterio no son las más favorables al momento de realizar las pruebas ya que factores como el ruido temperatura afectan el comportamiento del roedor.

Tabla 8-3: Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos de tiempo en Cuarto Claro y Cuarto oscuro

TIEMPO CUARTO CLARO				
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1	2	3
BLANCO	5	2,3444		
D1 MO	5	2,8455		
D2 MO	5		3,5215	
D3 MO	5		3,8056	3,8056
CONTROL	5			4,2719
Sig.		,041	,063	,427
TIEMPO CUARTO OSCURO				
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1	2	3
CONTROL	5	,4033		
D3 MO	5	,5316		
D2 MO	5	,7278		
D1 MO	5		1,2132	
BLANCO	5		1,5239	
Sig.		,022	,030	

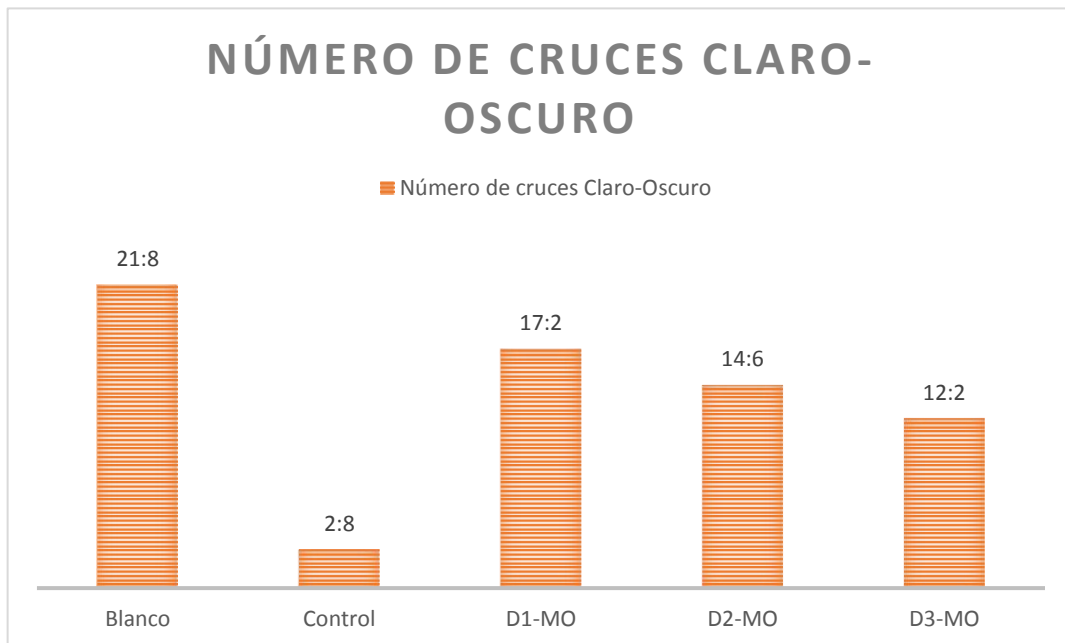
Realizado por: Yajayra Medina, 2019.

3.6.1.2. Número de cruces cuarto claro-oscuro, distancia recorrida y velocidad media

Tabla 9-3: Número de cruces cuarto claro-oscuro, distancia recorrida y velocidad media

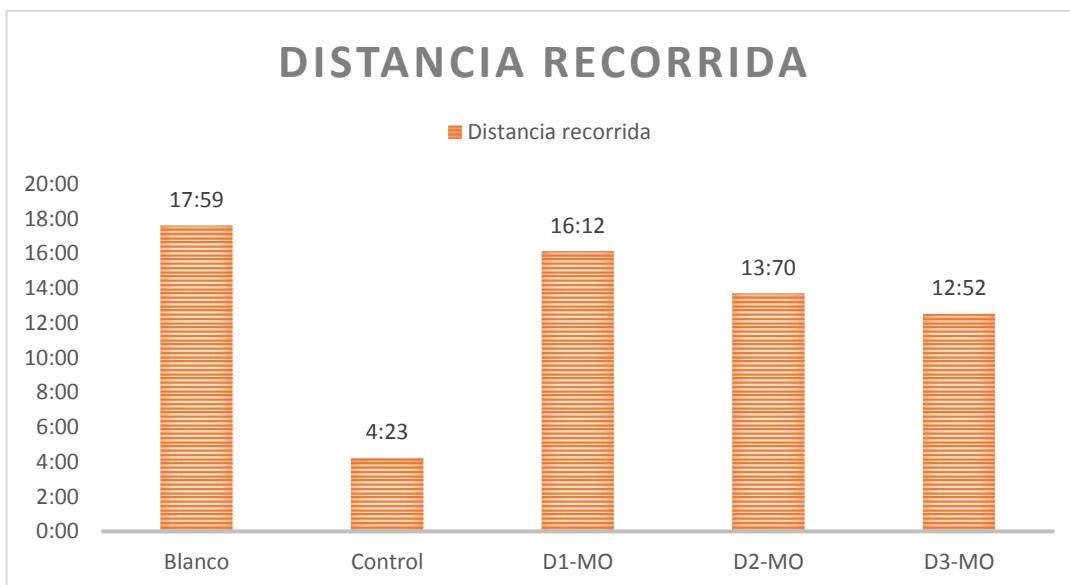
Grupos	Número de cruces Claro-Oscuro	Distancia recorrida (Metros)	Velocidad media (m/s)
Blanco	21,80	17,59	0,06
Control	2,80	4,23	0,02
D1-MO	17,20	16,12	0,05
D2-MO	14,60	13,70	0,04
D3-MO	12,20	12,52	0,04

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

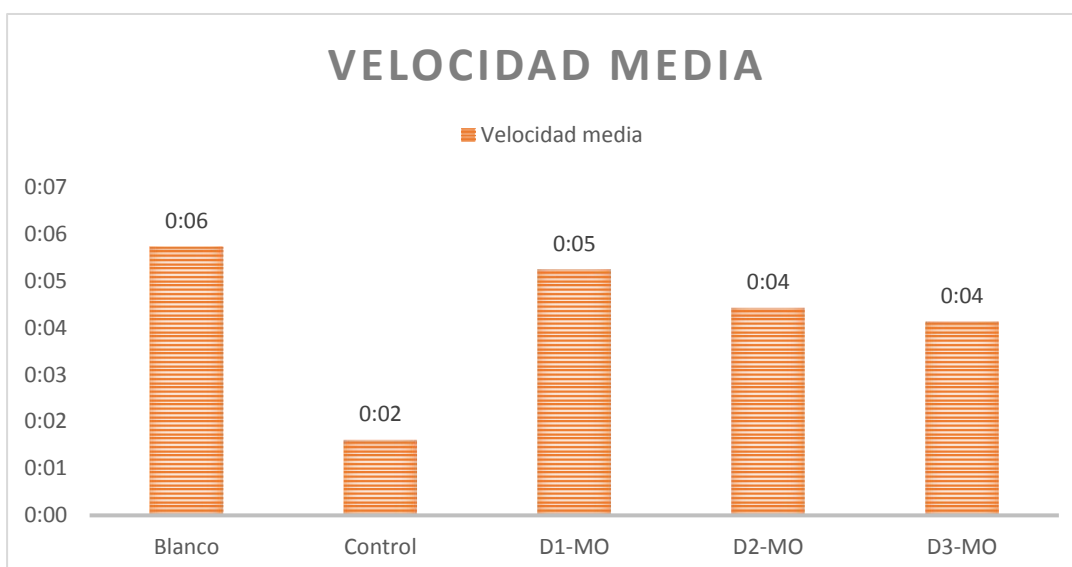


Gráficos 2-3: Número de cruces en el cuarto Claro-Oscuro obtenidos en las pruebas a diferentes concentraciones.

Realizado por: Yajayra Medina, 2019



Gráficos 3-3: Distancia recorrida obtenida en los distintos tratamientos.
Realizado por: Yajayra Medina, 2019



Gráficos 4-3: Velocidad media obtenida de los diferentes tratamientos.
Realizado por: Yajayra Medina, 2019

Se puede observar el número de cruces del cuarto claro al oscuro, la distancia recorrida y la velocidad media en los gráficos 2-3, 3-3 y 4-3 respectivamente, el menor valor de cada uno de estos parámetros se da en el control con 2,80, 4,23 m y 0,02 m/s. Los demás tratamientos presentan valores similares al blanco. Se determinó que ninguna de las concentraciones afecta locomoción del roedor. A diferencia del control que afecta drásticamente la locomoción, siendo el principal problema de los medicamentos comercializados, a medida que aumentan las concentraciones el número de cruces, velocidad media y distancia recorrida disminuye.

Tabla 4-3: Test ANOVA para el número de cruces para cuarto claro-oscuro, distancia recorrida y velocidad media.

ANOVA					
CUARTO CLARO-OSCURO					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	998,640	4	249,660	49,733	,000
Dentro de grupos	100,400	20	5,020		
Total	1099,040	24			
DISTANCIA RECORRIDA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	541,337	4	135,334	48,487	,000
Dentro de grupos	55,823	20	2,791		
Total	597,160	24			
VELOCIDAD MEDIA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,005	4	,001	39,587	,000
Dentro de grupos	,001	20	,000		
Total	,006	24			

Realizado por: Yajayra Medina, 2019.

En la Tabla 10-3 se observan los p-valores del test ANOVA, para las medias en el número de cruces, distancia recorrida y velocidad media, siendo estos menores al nivel de significancia (indicador de que existen diferencias significativas).

El test post-hoc HSD Tukey (Tabla 11-3), muestra el número de cruces en el claro-oscuro, distancia recorrida y velocidad media, se observa la formación de tres subconjuntos homogéneos, en los cuales se encuentra que: el control no se agrupa con ninguno, se agrupan D1-MO, D2-MO Y D3-MO y en el último el blanco se asocia con D1-MO y D2-MO. El subconjunto que presenta mayor probabilidad es el del control, indicando que la administración del medicamento disminuye la capacidad motora del roedor. Analizando los otros subconjuntos se puede evidenciar que el blanco se agrupa con la D1-MO y D2-MO, indicando que la actividad motora no fue afectada y que el roedor se encuentra explorando el equipo.

Tabla 11-3: Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos para el número de cruces para cuarto claro-oscuro, distancia recorrida y velocidad media

Cuarto claro-oscuro				
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1	2	3
CONTROL	5	2,8000		
D3 MO	5		12,2000	
D2 MO	5		14,6000	
D1 MO	5		17,2000	17,2000
BLANCO	5			21,8000
Sig.		1,000	,016	,029
Distancia recorrida				
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1	2	3
CONTROL	5	4,2318		
D3 MO	5		12,5225	
D2 MO	5		13,6950	13,6950
D1 MO	5		16,1191	16,1191
BLANCO	5			17,5921
Sig.		1,000	,021	,011
Velocidad media				
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1	2	3
CONTROL	5	,0161		
D3 MO	5		,0413	
D2 MO	5		,0442	,0442
D1 MO	5		,0524	,0524
BLANCO	5			,0573
Sig.		1,000	,040	,013

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

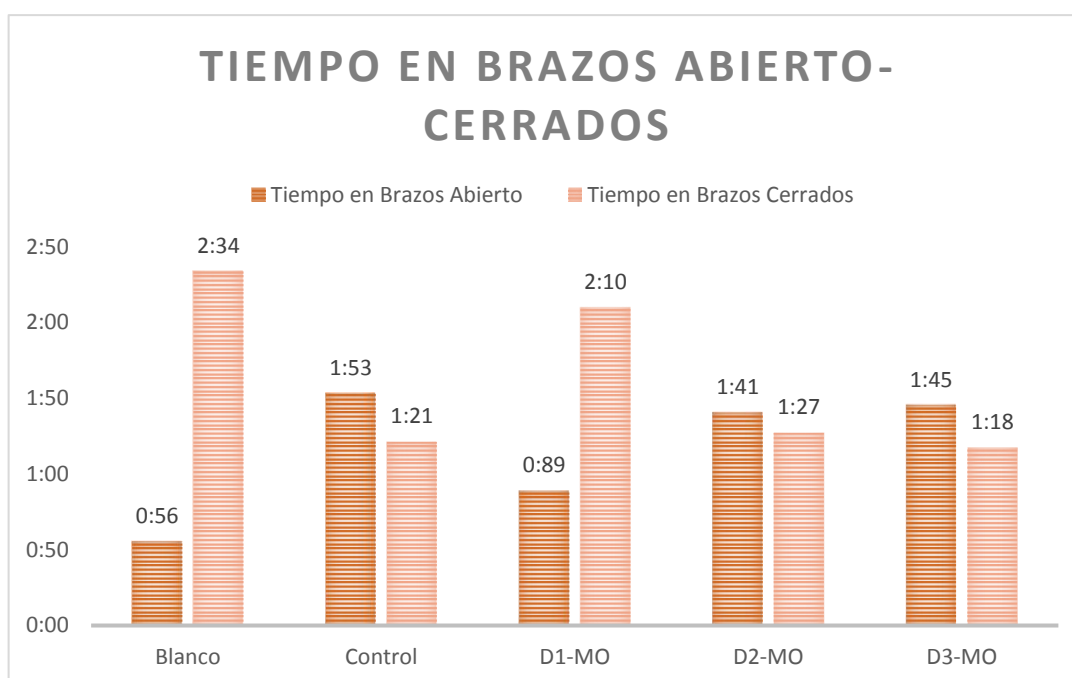
3.6.2. *Equipo electrónico de medición laberinto elevado en cruz*

3.6.2.1. *Tiempo en brazos abiertos y cerrados*

Tabla 12-3: Resultados obtenidos del tiempo en brazos abiertos y cerrados

Grupos	Tiempo en Brazos Abierto (Minutos)	Tiempo en Brazos Cerrados (Minutos)
Blanco	0,56	2,34
Control	1,53	1,21
D1-MO	0,89	2,10
D2-MO	1,41	1,27
D3-MO	1,45	1,18

Realizado por: Yajayra Medina, 2019



Gráficos 5-3: Resultados obtenidos del Tiempo en Brazos Abiertos-Cerrados en los diferentes tratamientos.

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

Se observa en el gráfico 5-3, el tiempo que permanece el animal en los brazos abiertos y cerrados, obteniendo como resultado que el control con la dosis D2-MO y D3-MO permanecen mayor tiempo en los brazos abiertos, mientras que en los brazos cerrados se encuentra mayor tiempo el blanco con la dosis D1-MO, siendo un indicio de ansiedad o estrés por parte del ratón.

Tabla 13-3: Test ANOVA para tiempo en brazos abiertos, medio y brazos cerrados

ANOVA					
Tiempo en brazos abiertos					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3,609	4	,902	46,778	,000
Dentro de grupos	,386	20	,019		
Total	3,994	24			
Tiempo en brazos cerrados					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	6,161	4	1,540	7,008	,001
Dentro de grupos	4,396	20	,220		
Total	10,557	24			

Realizado por: Yajayra Medina, 2019.

En la tabla 13-3 se evidencian los valores obtenidos al realizar el test ANOVA, indicando que las medias son menores al nivel de significancia por lo cual se concluye que existen diferencias significativas.

Los resultados obtenidos en la tabla 14-3 en el Test post- hoc HSD Tukey, se observa la formación de tres subconjuntos en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos, el subgrupo de mayor probabilidad en el que está formado por el Blanco y la dosis D1-MO, en cuanto el tiempo que permanecen en los brazos cerrados, se establecen dos subgrupos homogéneos, el control con las demás dosis constituyen el grupo de mayor probabilidad. Se puede concluir que las dosis D2-MO y D3-MO presentan actividad ansiolítica debido a que el forman un grupo con el control y este se encuentra mayor tiempo en los brazos abiertos y menor tiempo en los brazos cerrados.

Tabla 14-3: Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos de tiempo en brazos abiertos, medio y brazos cerrados

Tiempo en brazos abiertos				
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1	2	3
BLANCO	5	,5583		
D1-MO	5		,8899	
D2-MO	5			1,4054
D3-MO	5			1,4549
CONTROL	5			1,5340
Sig.		1,000	1,000	,596
Tiempo en brazos cerrados				
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1	2	
D3-MO	5	1,1750		
CONTROL	5	1,2122		
D2-MO	5	1,2713	1,2713	
D1-MO	5	2,0975	2,0975	
BLANCO	5		2,3400	
Sig.		,039	,014	

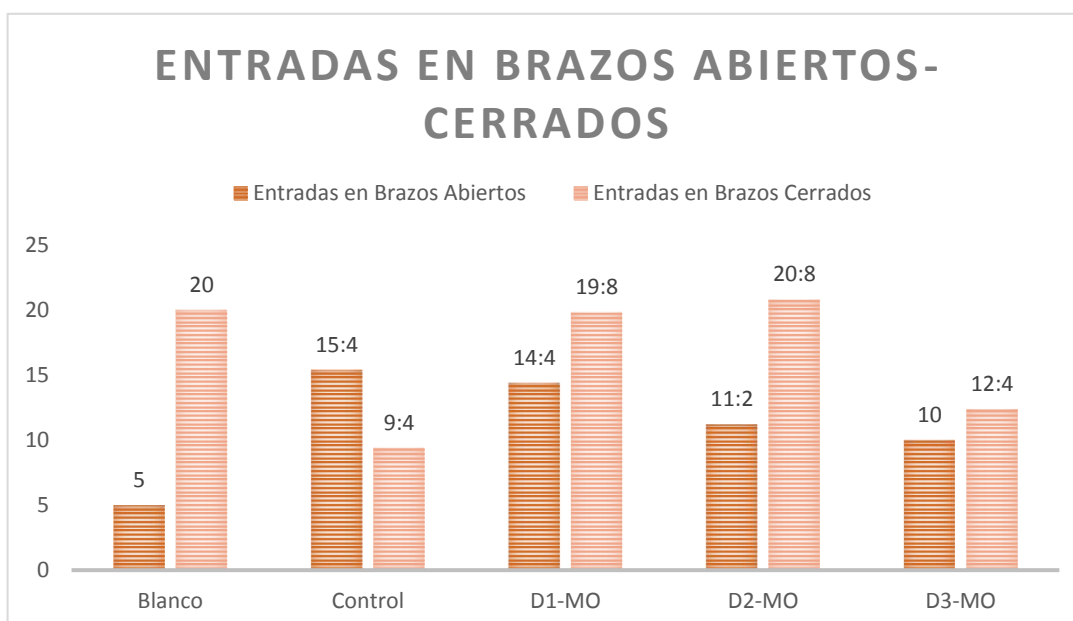
Realizado por: Yajayra Medina, 2019

3.6.2.2. *Entradas en brazos abiertos y cerrados*

Tabla 15-3: Resultados obtenidos de entradas en brazos abiertos y cerrados

Grupos	Entradas en Brazos Abiertos	Entradas en Brazos Cerrados
Blanco	5	20
Control	15,4	9,4
D1-MO	14,4	19,8
D2-MO	11,2	20,8
D3-MO	10	12,4

Realizado por: Yajayra Medina, 2019



Gráficos 6-3: Número de entradas en brazos abiertos y cerrados obtenidas en los diferentes tratamientos.

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

En el gráfico 6-3, se evidencia el número de entradas a brazos abiertos y cerrados, el control tiene mayor número de entradas a los brazos abiertos que a los cerrados, mientras que las dosis D1-MO, D2-MO y D3-MO y el blanco, muestran más número de entradas a los brazos cerrados que a los brazos abiertos, revelando que las administraciones de los diferentes tratamientos no afectan la actividad locomotora.

Tabla 16-3: Test ANOVA para entradas a brazos abiertos y brazos cerrados

ANOVA					
Entradas a brazos abiertos					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	365,840	4	91,460	22,417	,000
Dentro de grupos	81,600	20	4,080		
Total	447,440	24			
Entradas a brazos cerrados					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	544,240	4	136,060	4,265	,012
Dentro de grupos	638,000	20	31,900		
Total	1182,240	24			

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

Se muestran los valores del test de ANOVA en la tabla 16-3, para el número de entradas en los brazos abiertos el valor es menor al nivel de significancia y mientras que en los brazos cerrados, el valor de p es mayor, demostrando que para este caso no hay diferencias significativas.

La tabla 17-3 presenta los resultados de la prueba de TUKEY, en el número de entradas a los brazos abiertos se muestran la formación de cuatro subconjuntos homogéneos. El subgrupo con mayor probabilidad es el formado por el blanco y la dosis D1-MO. Por otro lado, el número de entrada en los brazos abiertos no presentan diferencias significativas, llevando a la conclusión que la actividad locomotora es similar en todos los tratamientos.

Tabla 17-3: Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos de entradas a brazos abiertos y entradas a brazos cerrados

Entradas a brazos abiertos					
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01			
		1	2	3	4
CONTROL	5	5,0000			
D2-MO	5	8,6000	8,6000		
D3-MO	5		10,0000	10,0000	
D1-MO	5			14,4000	14,4000
BLANCO	5				15,4000
Sig.		,071	,807	,019	,933
Entradas a brazos cerrados					
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01			
		1			
CONTROL	5	9,4000			
D3-MO	5	12,4000			
D1-MO	5	19,8000			
BLANCO	5	20,0000			
D2-MO	5	20,8000			
Sig.		,033			

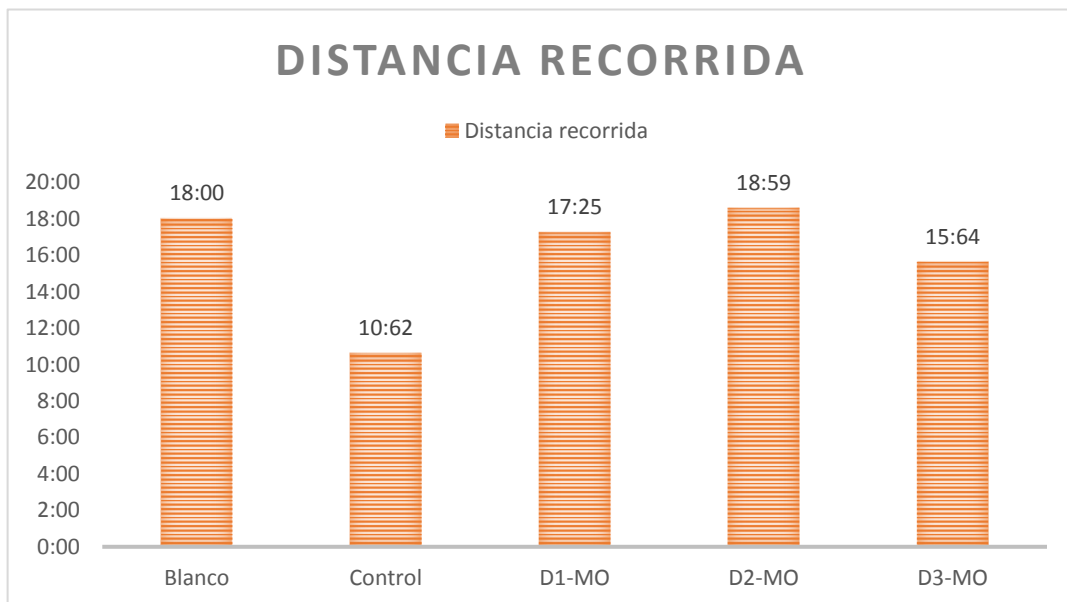
Realizado por: Yajayra Medina, 2019.

3.6.2.3. Distancia recorrida y velocidad media

Tabla 18-3: Resultados obtenidos de la distancia recorrida y velocidad media

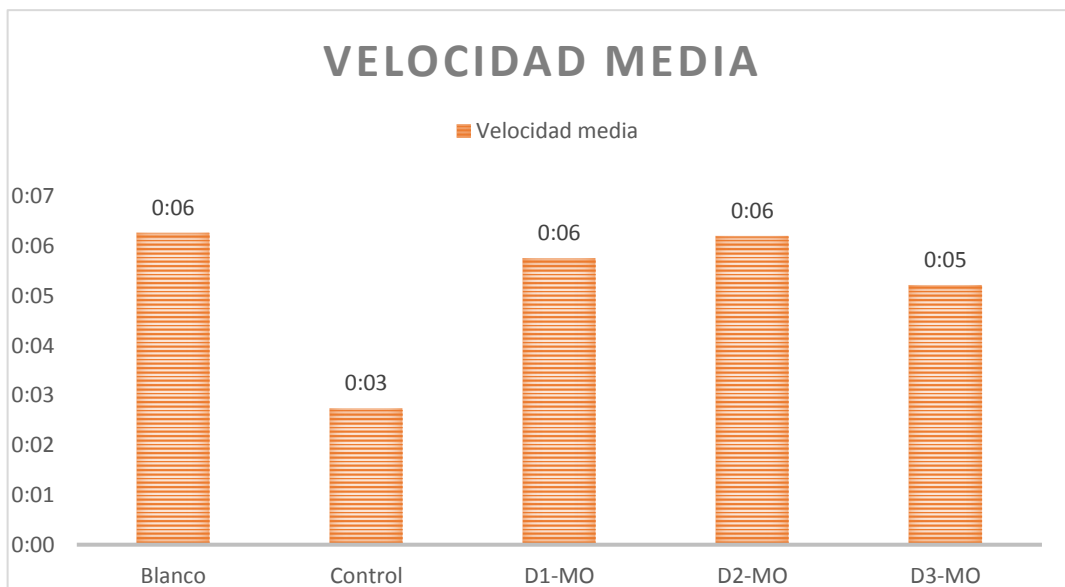
Grupos	Distancia recorrida (Metros)	Velocidad media (m/s)
Blanco	18,00	0,06
Control	10,62	0,03
D1-MO	17,25	0,06
D2-MO	18,59	0,06
D3-MO	15,64	0,05

Realizado por: Yajayra Medina, 2019



Gráficos 7-3: Distancia recorrida obtenida en los distintos tratamientos.

Realizado por: Yajayra Medina, 2019



Gráficos 8-3: Velocidad media obtenida de los diferentes tratamientos.

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

Se evidencia en los Gráficos 7-3 y 8-3, la distancia recorrida y la velocidad media de los diferentes tratamientos, en los cuales el menor valor se encuentra en el control, mientras que se presentan valores similares con el blanco y las demás dosis, estos parámetros sirven de indicio de la actividad locomotora.

Tabla 19-3: Test ANOVA para la distancia recorrida y velocidad media

ANOVA					
Distancia recorrida					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	206,682	4	51,670	10,529	,000
Dentro de grupos	98,150	20	4,908		
Total	304,832	24			
Velocidad media					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,004	4	,001	11,483	,000
Dentro de grupos	,002	20	,000		
Total	,006	24			

Realizado por: Yajayra Medina, 2019.

En la tabla 19-3 se observan los resultados del test de ANOVA en cuanto 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 que existen diferencias significativas entre las medias.

Se observan los resultados del test de TUKEY (tabla 20-3), la distancia recorrida y velocidad media, en los cuales se forman dos subconjuntos homogéneos, el subgrupo de mayor probabilidad en la distancia recorrida está liderado por el blanco con las demás dosis, mientras que en la velocidad media el subconjunto de mayor probabilidad está formado únicamente por el control, esto indica que la administración de cada uno de los extractos de *Melissa officinalis* no afecta la actividad locomotora y su capacidad de exploración de ratón.

Tabla 20-3: Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos de distancia recorrida y velocidad media

Distancia recorrida			
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01	
		1	2
CONTROL	5	10,6246	
D3-MO	5	15,5894	15,5894
D1-MO	5		17,2524
BLANCO	5		18,0012
D2-MO	5		18,5884
Sig.		,016	,242
Velocidad media			
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01	
		1	2
CONTROL	5	,0274	
D3-MO	5		,0521
D1-MO	5		,0575
D2-MO	5		,0620
BLANCO	5		,0627
Sig.		1,000	,435

Realizado por: Yajayra Medina, 2018

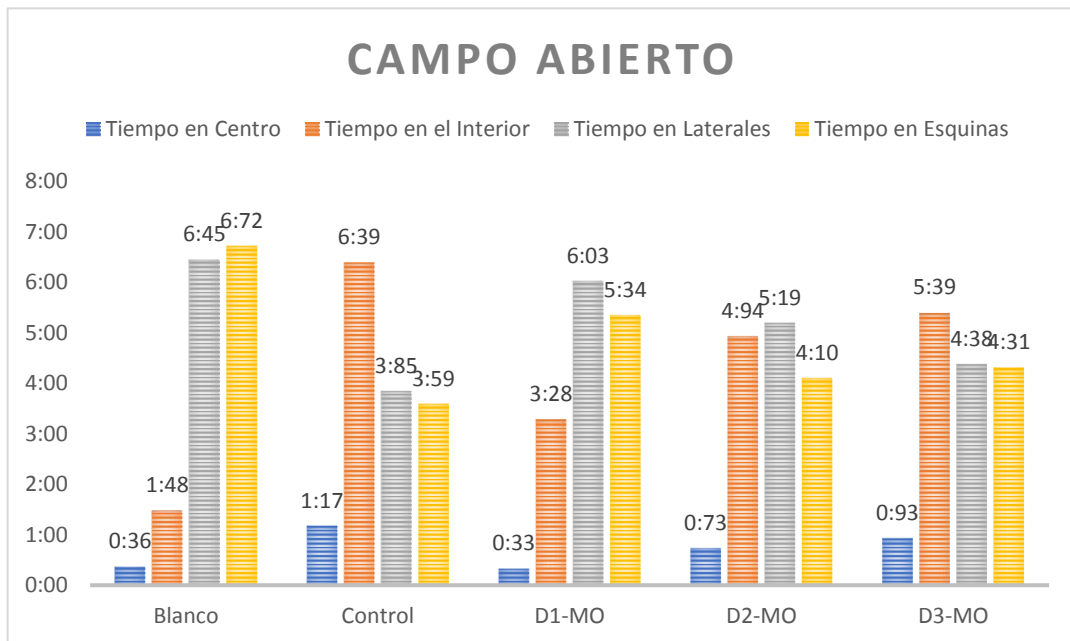
3.6.3. Equipo electrónico de medición campo abierto

3.6.3.1. Tiempo en el centro, interior, laterales y esquinas

Tabla 5-3: Resultados obtenidos del Tiempo en el centro, interior, laterales y esquinas

Grupos	Tiempo en Centro (Minutos)	Tiempo en el Interior (Minutos)	Tiempo en Laterales (Minutos)	Tiempo en Esquinas (Minutos)
Blanco	0,36	1,48	6,45	6,72
Control	1,17	6,39	3,85	3,59
D1-MO	0,33	3,28	6,03	5,34
D2-MO	0,73	4,94	5,19	4,10
D3-MO	0,93	5,39	4,38	4,31

Realizado por: Yajayra Medina, 2019



Gráficos 9-3: Tiempo de permanencia en el centro, interior, laterales, esquinas obtenidos de los diferentes tratamientos.

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

En el gráfico 9-3 se observan los tiempos de permanencia del roedor en las esquinas, laterales, interior y centro del equipo, el control con la D2-MO y D3-MO permanecen mayor tiempo en el centro e interior del equipo, mientras que el Blanco, D1-MO y D2-MO, presentan mayor tiempo de permanencia en los laterales y esquinas, los roedores tienden a permanecer en las esquinas y laterales cuando más ansiosos se encuentran.

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

ANOVA					
Tiempo en el centro					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2,649	4	,662	18,107	,000
Dentro de grupos	,731	20	,037		
Total	3,380	24			
Tiempo en el interior					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	74,752	4	18,688	86,735	,000
Dentro de grupos	4,309	20	,215		
Total	79,061	24			
Tiempo en los laterales					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	23,735	4	5,934	8,759	,000
Dentro de grupos	13,549	20	,677		
Total	37,284	24			
Tiempo en las esquinas					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	30,790	4	7,697	8,233	,000
Dentro de grupos	18,699	20	,935		
Total	49,489	24			

Realizado por: Yajayra Medina, 2019.

Se observan los p-valores del test ANOVA en la tabla 22-3, determinando que los tiempos en el centro, interior, laterales y esquinas, en los cuales el nivel de significancia es menor a 0,01, es decir existen diferencias significativas en los tiempos.

Los resultados del test de TUKEY (tabla 23-3), evidencian que el tiempo en el centro, interior, esquinas y laterales, se observa la formación de subconjuntos homogéneos, en los cuales el subconjunto que tiene mayor probabilidad en el tiempo de permanencia en el centro es el que está formado por el control, D2-MO y D3-MO. Mientras que un mayor tiempo de permanencia en el interior se da por el Blanco y el D1-MO, indicando estadísticamente que los valores son similares, el subgrupo con mayor posibilidad en el tiempo de permanencia en los laterales está formado por el blanco, y las dosis D1-MO y D2-MO. El valor similar en el tiempo de permanencia en las esquinas está formado por el blanco y las dosis D1-MO.

Del análisis de cada uno de los parámetros se puede determinar que el control, D2-MO y D3-MO se encuentran mayor tiempo en el centro e interior, presentando actividad ansiolítica ya que presentan características estadísticamente similares con el control. Mientras que el blanco y las dosis D1-MO y D2-MO presentan valores estadísticamente similares en el tiempo en los laterales y esquinas, demostrando que posiblemente estas concentraciones no presentan actividad ansiolítica por agruparse con el blanco. Estos datos coinciden con los resultados obtenidos del extracto de *Hypericum laricifolium*, cuyas dosis de 100 y 200 ppm presentarían actividad ansiolítica, destacando principalmente las dosis de 100 y 200 ppm al agruparse en la mayoría de los equipos con el control.

Tabla 23-3: Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos del tiempo de permanencia en el centro, interior, laterales y esquinas

Tiempo en el centro					
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01			
		1	2		
D1 MO	5	,3268			
BLANCO	5	,3644			
D2 MO	5	,7291	,7291		
D3 MO	5		,9304		
CONTROL	5		1,1733		
Sig.		,012	,025		
Tiempo en el interior					
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01			
		1	2	3	4
BLANCO	5	1,4828			
D1 MO	5		3,2839		
D2 MO	5			4,9371	
D3 MO	5			5,3939	5,3939
CONTROL	5				6,3926
Sig.		1,000	1,000	,540	,021

Tiempo en los laterales				
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1	2	3
CONTROL	5	3,8450		
D3 MO	5	4,3756	4,3756	
D2 MO	5	5,1939	5,1939	5,1939
D1 MO	5		6,0261	6,0261
BLANCO	5			6,4456
Sig.		,110	,035	,155
Tiempo en las esquinas				
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01		
		1	2	
CONTROL	5	3,5899		
D2 MO	5	4,0983		
D3 MO	5	4,3089		
D1 MO	5	5,3417	5,3417	
BLANCO	5		6,7150	
Sig.		,065	,204	

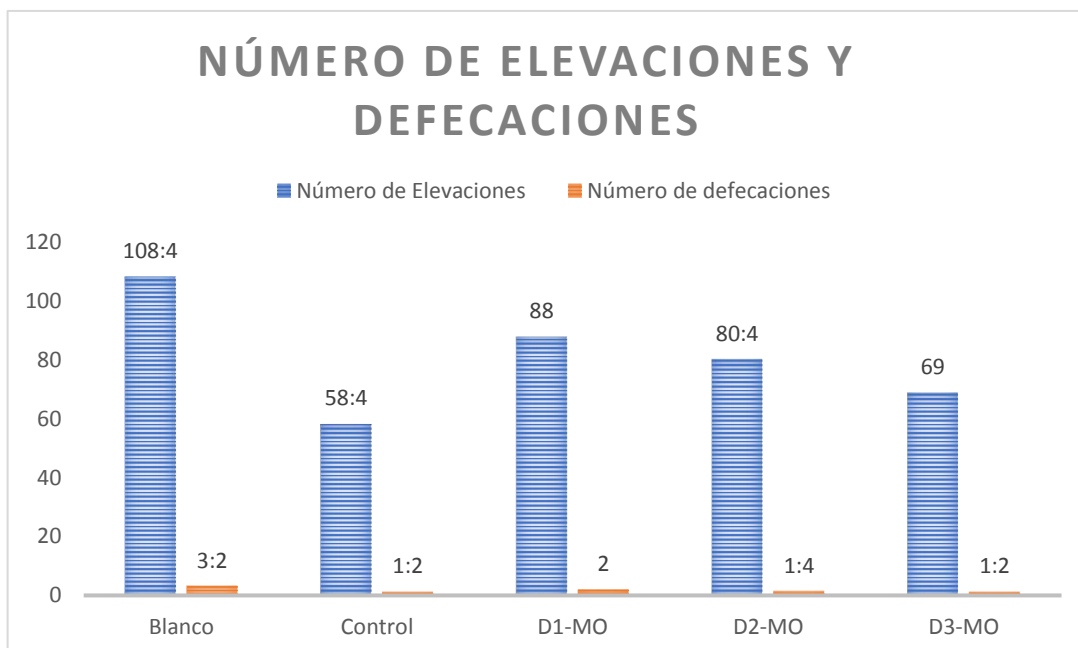
Realizado por: Yajayra Medina, 2019

3.6.3.2. Número de defecaciones y elevaciones

Tabla 24-3: Resultados obtenidos del número de elevaciones y defecaciones

Grupos	Número de Elevaciones	Número de defecaciones
Blanco	108,4	3,2
Control	58,4	1,2
D1-MO	88	2
D2-MO	80,4	1,4
D3-MO	69	1,2

Realizado por: Yajayra Medina, 2019



Gráficos 10-3: Número de elevaciones y defecaciones obtenidos en los distintos tratamientos.
Realizado por: Yajayra Medina, 2019

Los resultados obtenidos del número de elevaciones y defecaciones (gráfico 10-3), demuestran que el mayor número de elevaciones se encuentra en el Blanco, D1-MO y D2-MO, en cuanto al número de defecaciones, el blanco y la D1-MO presenta un mayor número. Estos parámetros son fundamentales al momento de determinar la actividad ansiolítica ya que a menor número existe una mayor efectividad de los extractos

Tabla 25-3: Test de ANOVA para número de elevaciones y defecaciones

ANOVA					
Elevaciones					
	Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	7273,760	4	1818,440	1,908	,148
Dentro de grupos	19061,600	20	953,080		
Total	26335,360	24			
Defecaciones					
	Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	14,400	4	3,600	4,615	,008
Dentro de grupos	15,600	20	,780		
Total	30,000	24			

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

En la tabla 25-3 se pueden observar los resultados del test de ANOVA para el número de elevaciones y el número de defecaciones, en los cuales el nivel de significancia en el número de elevaciones es mayor a 0,01, es decir, no existen diferencias significativas, existe un menor nivel de significancia en el número de defecaciones.

Tabla 26-3: Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos para número de defecaciones y elevaciones

Elevaciones			
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01	
		1	2
CONTROL	5	58,40	
D3 MO	5	69,00	
D2 MO	5	80,40	
D1 MO	5	88,00	
BLANCO	5	108,40	
Sig.		,117	
Defecaciones			
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01	
		1	2
CONTROL	5	1,20	
D3 MO	5	1,20	
D2 MO	5	1,40	
D1 MO	5		2,00
BLANCO	5		3,20
Sig.		,014	,009

Realizado por: Yajayra Medina, 2019.

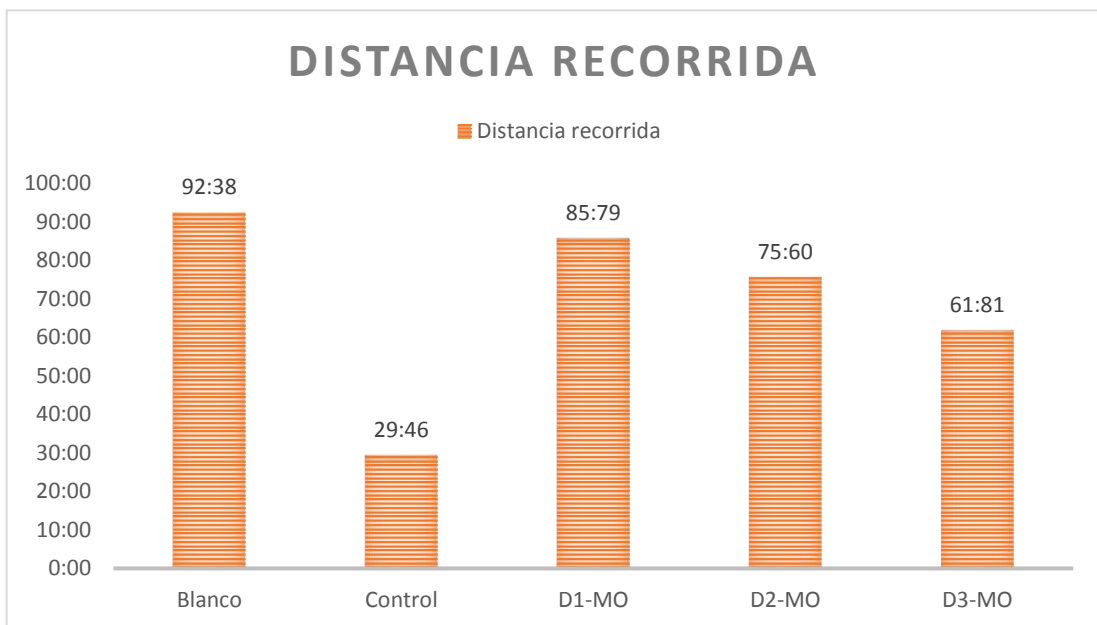
Se puede evidenciar los resultados obtenidos en el test de TUKEY (tabla 26-3), para el número de elevaciones y defecaciones, en el número de elevaciones no se encuentran diferencias significativas, mientras que en el número de defecaciones se observa la formación de dos subgrupos, el que presenta mayor probabilidad es el subgrupo formado por el control, D2-MO y D3-MO. Estos al encontrarse con el control presentan menor número de defecaciones por lo tanto el roedor se encuentra relajado.

3.6.3.3. Distancia recorrida y velocidad media

Tabla 27-3: Resultados obtenidos de la distancia recorrida y la velocidad media

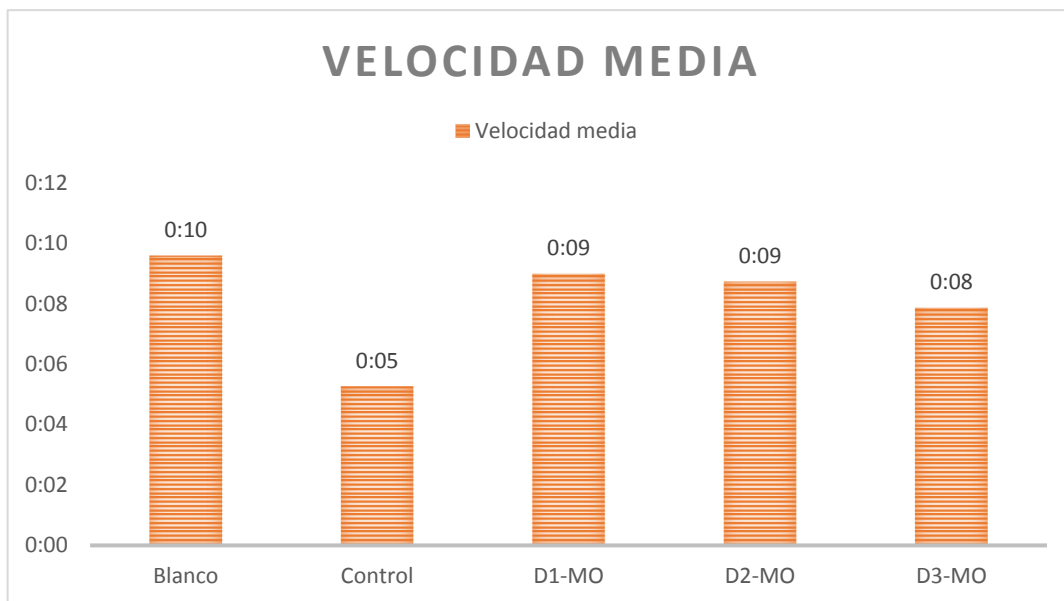
Grupos	Distancia recorrida (m)	Velocidad media (m/s)
Blanco	92,38	0,10
Control	29,46	0,05
D1-MO	85,79	0,09
D2-MO	75,60	0,09
D3-MO	61,81	0,08

Realizado por: Yajayra Medina, 2019



Gráficos 11-3: Distancia recorrida obtenida en los diferentes tratamientos

Realizado por: Yajayra Medina, 2019.



Gráficos 12-3: Velocidad media obtenida en los diferentes tratamientos
Realizado por: Yajayra Medina, 2019.

En el gráfico 11-3 se presentan los resultados de la distancia recorrida y en el gráfico 12-3, se evidencia la velocidad media, determinando que el blanco, D1-MO, D2-MO y D3-MO, presentan mayor distancia recorrida y velocidad media, el control (Clonazepam) disminuye actividad locomotora por lo cual el ratón explora y se mueve menos.

Tabla 28-3: Test ANOVA para distancia recorrida y velocidad media

ANOVA					
Distancia recorrida					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	12437,260	4	3109,315	10,178	,000
Dentro de grupos	6109,945	20	305,497		
Total	18547,204	24			
Velocidad media					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,006	4	,001	1,275	,001
Dentro de grupos	,012	20	,001		
Total	,018	24			

Realizado por: Yajayra Medina, 2019.

Tabla 29-3: Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos de distancia recorrida y velocidad media

Distancia recorrida			
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01	
		1	2
CONTROL	5	29,4604	
D3 MO	5	61,8072	61,8072
D2 MO	5		75,5992
D1 MO	5		85,7911
BLANCO	5		92,3847
Sig.		,057	,079
Velocidad media			
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.01	
		1	2
CONTROL	5		,0527
D3 MO	5	,0787	
D2 MO	5	,0873	
D1 MO	5	,0899	
BLANCO	5	,0960	
Sig.		,071	,005

Realizado por: Yajayra Medina, 2019.

La tabla 29-3 evidencia los resultados obtenidos en el test de TUKEY para la distancia recorrida y velocidad media, en los cuales se han formado 2 subconjuntos homogéneos, en los dos parámetros se encuentra el valor con mayor probabilidad formado por el blanco, D1-MO, D2-MO y D3-MO, lo cual indica que después de la administración de cada uno de los extractos la actividad locomotora no se ve afectada.

3.6.4. *Discusión general de los resultados*

Tabla 30-3: Resumen estadístico de los grupos formados por el blanco control y las diferentes dosis, en los parámetros para determinar la actividad ansiolítica y sedante

Laberinto en cruz Elevado			
Brazos abiertos	Control, D1-MO, D2-MO y D3-MO	Brazos cerrados	Blanco y D1-MO
Cuarto Claro – Oscuro			
Cuarto claro	Control y D3-MO	Cuarto oscuro	Blanco y D1-MO
Campo Abierto			
Centro	Control, D2-MO y D3-MO	Interior	Blanco y D1-MO
Laterales	Blanco, D1-MO y D2-MO.	Esquinas	Blanco y D1-MO
Elevaciones	Control, Blanco, D1-MO, D2-MO y D3-MO	Defecaciones	Control, D2-MO y D3-MO

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

Tabla 31-3: Resumen estadístico de los grupos formado por el blanco, control y las diferentes dosis en los parámetros para evaluar actividad locomotora

	Laberinto en cruz elevado	Cuarto Claro - Oscuro	Campo Abierto
Distancia recorrida	Blanco, D1-MO, D2-MO y D3-MO	Control	Blanco, D1-MO, D2-MO y D3-MO
Velocidad media	Control	Control	Blanco, D1-MO, D2-MO y D3-MO
Cruces	-	Control	-
Ent. Brazos abiertos	Blanco, D1-MO	-	-
Ent. Brazos cerrados	Control, Blanco, D1-MO, D2-MO y D3-MO	-	-

Realizado por: Yajayra Medina, 2019

Las tablas 30-3 y 31-3 se muestra un resumen de los valores estadísticos obtenidos en las pruebas de actividad ansiolítica, sedante y locomoción de los roedores en los distintos equipos electrónicos, para evaluar el comportamiento ansiolítico de cada una de las dosis se comparó con el Control (Clonazepam) en los cuales dos de las tres dosis evaluadas presentan resultados estadísticamente similares, además de no afectar la actividad de locomoción.

Resultados del Equipo electrónico de medición campo claro-oscuro (CCO)

Los resultados obtenidos de la actividad ansiolítica en este equipo muestran que la dosis D3-MO, presenta actividad ya que al ser comparada con el Clonazepam (Control Positivo), presentan valores estadísticamente similares en el tiempo de permanencia en el cuarto claro, al comparar los valores individuales podemos evidenciar que las demás dosis también permanecen mayor tiempo en el cuarto claro pero no se asemejan a los valores de permanencia del control, esto se debe a que el roedor se mantiene estático en un solo lugar y tiene menor movilidad. Para evaluar la actividad locomotora se comparará el número de cruces claro-oscuro, distancia recorrida y velocidad media, los resultados obtenidos en estos parámetros muestran que el control no se encuentra agrupado con ninguna de las dosis, es decir, la administración de cada uno de los extractos no afecta la locomoción en los roedores.

Los resultados obtenidos en este equipo para *Peperomia peltigera*, determinan que las dosis que presentan actividad ansiolítica son las dosis de 25, 50, 100, 200 y 300 mg/kg ya que se agrupan con el control, mientras que las dosis de 25 y 100 mg/kg no afectan la actividad locomotora al formar grupos con el blanco.

Resultados del Equipo electrónico de medición Laberinto elevado en cruz (LCE)

Mediante el análisis de cada uno de parámetros que se presentan en este equipo se puede determinar que las dosis D2-MO y D3-MO presentan actividad ansiolítica, debido a que se agrupan con el clonazepam en el tiempo de permanencia en los brazos cerrados, aunque la dosis D1-MO se encuentre en este grupo no se le puede considerar como un dato significativo ya que se agrupa de igual manera con el blanco en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos. Hay que tener en cuenta que a mayor tiempo de permanencia en los brazos cerrados el roedor se encuentra ansioso y estresado. También se analizaron los parámetros para determinar la actividad locomotora en los cuales se encuentra formado por el blanco y D1-MO en las entradas a los brazos abiertos, es decir esta dosis no afecta la locomoción del roedor, en la velocidad media y distancia recorrida se puede observar que se forman subgrupos con el blanco, D1-MO, D2-MO y D3-MO. Concluyendo que no se ve afectada la actividad locomotora al administrar los extractos.

Los estudios realizados de *Hypericum laricifolium* en este equipo determinan que las dosis de 50, 100 y 200mg/kg son las dosis que presentan mayor actividad ansiolítica, ya que forman subconjuntos homogéneos con el control y tienen mayor tiempo de permanencia en los brazos abiertos, de igual manera ninguna de las dosis afecta la actividad locomotora del roedor.

Las dosis efectivas para este equipo de *Peperomia peltigera* son de 25, 50, 100, 200 mg/kg, que presentamos valores estadísticamente similares al control en los tiempos de permanencia en los brazos abiertos y cerrados, mientras que las dosis que más afectan la locomoción son los tratamientos de 100, 200 y 300 mg/kg.

Resultados del Equipo electrónico de medición campo abierto (CA)

Al analizar los resultados de cada uno de los parámetros que determinan la actividad ansiolítica en este equipo, muestran que las dosis D2-MO y D3-MO, presentan actividad ansiolítica debido a que poseen valores estadísticamente similares al control, estos se encuentran formando subconjuntos homogéneos tanto en el centro como interior del equipo, los valores obtenidos en el tiempo de que permanecen en las esquinas y laterales se encuentra formado por el blanco y D1-MO, demostrando que en esta dosis no existe actividad ansiolítica. En las elevaciones no se encuentran diferencias significativas entre ninguna de las medias analizadas. Las defecaciones son fundamentales al momento de determinar si el ratón está estresado o no, debido a que, a mayor estrés va a existir un mayor número de defecaciones, los resultados obtenidos en este análisis determinan que el D2-MO y D3-MO presentan valores similares, y al agruparse con el control el roedor se encuentra relajado. Otros de los parámetros analizados son la velocidad media y la distancia recorrida, al agruparse las dosis D1-MO, D2-MO y D3-MO con el blanco, estadísticamente se determina que al administrar cada una de las dosis no afecta el nivel exploración ni locomoción del roedor.

Según estudios realizados, el extracto a dosis de dosis 100 y 200 ppm de *Hypericum laricifolium*, presentaría actividad ansiolítica, ya que presenta tiempos similares en el centro e interior. Las dosis de 25 y 50 ppm se asemejan a los tiempos que permanece el blanco en los laterales y esquinas. Los distintos extractos no afectan la actividad locomotora.

CONCLUSIONES

Se determinó de manera cualitativa los metabolitos secundarios que se encuentran en la especie vegetal, obteniendo metabolitos como: compuestos grasos, alcaloides, quinonas, triterpenos, esteroides, flavonoides, fenoles, taninos, azúcares reductores, mucílagos, catequinas y principios amargos.

El control de calidad realizado a la droga vegetal y al extracto hidroalcohólico de las Hojas de *Melissa officinalis*, cumplieron con los rangos establecidos por la USP#35, garantizando así su seguridad para análisis posteriores.

Se cuantificó la cantidad de fenoles y flavonoides presentes en el extracto de las Hojas de *Melissa officinalis*, obteniendo una cantidad de fenoles totales de 34,5 mg Equivalentes de ácido Gálico/g de extracto seco y para flavonoides totales de 30.48 mg Equivalentes de Quercetina/g de extracto seco.

La concentración del extracto Hidroalcohólico de *Melissa officinalis*, con mayor actividad ansiolítica en ratones, fueron las dosis de 100 mg/kg y 200 mg/ kg, ya que se encuentran formando subconjuntos con el control, en todos los parámetros analizados en cada uno de los equipos electrónicos. La actividad locomotora y de exploración de los roedores no fue afectada significativamente ya que no se formaron grupos homogéneos con el control, por lo tanto, se considera que estas dosis presentan actividad ansiolítica sin afectar la locomoción, siendo una de las ventajas frente a un fármaco sintético.

RECOMENDACIONES

Tomar en cuenta el lugar, fecha y época del año en el que se recolecta la planta, ya que estas condiciones afectan en la cantidad de metabolitos.

Realizar más estudios con distinta vía de administración y dosis para evaluar el efecto ansiolítico de *Melissa officinalis*.

Realizar próximos estudios con otras actividades farmacológicas, ya que *Melissa officinalis* presenta metabolitos de gran interés.

Se recomienda realizar estudios de la toxicidad del extracto de las hojas de *Melissa officinalis*, para determinar los riesgos que puede ocasionar la administración de esta especie vegetal especialmente a dosis de 100 ppm y 200 ppm.

Se sugiere al momento de realizar las pruebas de ansiedad en los distintos equipos electrónicos, el bioterio se encuentre en completo silencio, realizar a una hora específica para que no haya mucha variación en el intervalo de tiempo, colocar correctamente los equipos y la cámara. Grabar los videos en el equipo electrónico “Claro-oscuro” por 10 minutos, “Laberinto cruz elevado 5 minutos” y el “Campo abierto” por 10-20 minutos.

Observar al momento de procesar los videos que no se encuentren manchas o exista una desviación en la trayectoria, de igual forma fijar el umbral correcto y verificar el recorte del video. Tomar en cuenta el umbral en cada uno de los equipos, ya que a menor umbral mayor visualización de la trayectoria del roedor.

Para obtener los resultados de los videos se recomienda utilizar una computadora con procesador Intel Core i7 y el programa IBM SPSS Statistics 25, obteniéndose así resultados más exacto.

BIBLIOGRAFÍA

Atanassova, M; et al. *Total Phenolic and Total Flavonoid Contents, Antioxidant Capacity and Biological Contaminants in Medicinal Herbs*. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy. 2011. 1(2), pp. 1-8.

Avello, M. & Cisternas, I. *Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile*. [En línea]. Chile. Artículo de revisión revista Médica de Chile. 2010. [Consulta: 26 de noviembre 2018]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v138n10/art14.pdf>

Carretero, M. *Plantas Medicinales Para Alteraciones Del Sueño, Ansiedad Y Depresión*. [En línea]. 2012. [Consulta: 23 de octubre 2018]. Disponible en: <https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/2012/10/30/53471.pdf>

Castañeda, A; et al. *Diagnóstico y Tratamiento de los Trastornos de Ansiedad en el Adulto*. [En línea]. México. 2010. [Consulta: 22 de noviembre 2018]. Disponible en: www.cenetec.salud.gob.mx

Celedonia, Tito. *“Evaluación De La Influencia De Las Proporciones De Hojas De Cedrón (Aloysia Citriodora), Toronjil (Melissa Officinalis) Y Stevia (Stevia Rebaudiana Bertoni) Para La Aceptabilidad De Un Filtrante Mix”*. [En línea] (tesis). (Maestría) Universidad Nacional de Huancavelica. Acobamba-Huancavelica. 2018. pp. 28-35. [Consulta: 12 de noviembre 2018]. Disponible en: <http://repositorio.unh.edu.pe/bitstream/handle/UNH/1883/TESIS2018TITO%20PALOMINO%20CELEDONIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Chávez, Álvaro & Torres, Vanesa. *Ansiedad*. Revista de actualización clínica investigación. [En línea]. 2013. Bolivia. v.35. pp.1-3. [Consulta: 03 de septiembre 2018]. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682013000800001&script=sci_arttext

Chávez, Z. *Servicio informativo del centro para el control estatal de la calidad de los medicamentos.* [En línea]. 2002. [Consulta: 12 de octubre 2018]. Disponible en: https://www.cecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/infocecmed/Info-43_44.pdf

Clínica de la ansiedad. *¿Cuáles son los síntomas de la ansiedad?* [En línea]. 2018. [Consulta: 18 de noviembre 2018]. Disponible en: <https://clinicadeansiedad.com/soluciones-y-recursos/preguntas-mas-frecuentes/cuales-son-los-sintomas-de-la-ansiedad/>

Craske, A; et al. *“Trastornos de ansiedad”.* Manual diagnóstico estadístico de los trastornos mentales (DSM-V). [En línea]. 2014. [Consulta: 28 de octubre 2018]. Disponible en: 10.1016/S0212-5382(07)70931-7

Di Sapio; et al. *Caracterización Morfoanatómica de Hoja, Tallo, F ruto y Semilla.* [En línea]. 2012. [Consulta: 15 de noviembre 2018]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85622739007.pdf>

Dueñas, E. *Extracto fluido de Melissa.* [En línea]. 2012. [Consulta: 23 de noviembre 2018]. Disponible en: <https://redsa.com.mx/descargas/fichastecnicas/extractos-fluidos/melisa.pdf>

Echegaray, M; et al. *Fitoterapia y sus aplicaciones.* [En línea]. España. 2011. [Consulta: 22 de octubre 2018]. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-podologia-224-pdf-X0210123811501573>.

ECURED *Lamiaceae.* [En línea]. 2018. [Consulta: 17 de agosto 2018]. Disponible en: <https://www.ecured.cu/Lamiaceae>

Educación helvética S.A. *Taxonomía de Melissa officinalis.* [En línea]. 2018. [Consulta: 17 de septiembre 2018]. Disponible en: <http://www.hondurassilvestre.com/search/taxa/taxa.aspx?tsn=32565>

Fiori & Bég. *Tabla de Botánica Sistemática*. [En línea]. 2015. [Consulta: 25 de septiembre 2018]. Disponible en: http://www.dipbot.unict.it/sistematica_es/lami_fam.html

Gallegos, R. & Castillo, G. *Modelos animales de miedo y ansiedad: descripciones neuro-conductuales*. [En línea]. 2015. [Consulta: 20 de septiembre 2018]. Disponible en: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/actualidades/article/view/14595/17243>

Gobierno Federal. *Diagnóstico y tratamiento de los trastornos de Ansiedad en adultos*. [En línea]. México. Guía Práctica Clínica. 2010. pp. 4-5. [Consulta: 17 Julio 2018.]. Disponible en: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/392_IMSS_10_Ansiedad/GR_R_IMSS_392_10.pdf

Guerra, M. “Validación De Dos Equipos (Laberinto En Cruz Elevado Y Campo Claro Oscuro) Para Evaluar La Actividad Ansiolítica En Ratones De Laboratorio. [En línea]. 2018. [Consulta: 23 noviembre 2018.]. Disponible en: <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/8900/1/56T00790.PDF>

Guillén, Paúl & Sarmiento, Germán. *Validación De Las Metodías Aplicadas A Los Procesos De Selección, Lavado, Secado Y Almacenamiento Para Plantas Medicinales A Través De Aplicación De Técnicas Oficiales Basadas En La Farmacopea*. [En línea] (tesis). Universidad de Cuenca. 2011. pp. 62-67 [Consulta: 06 septiembre 2018.]. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2457/1/tq1100.pdf>

INFOJARDÍN. *Melissa officinalis*. [En línea]. 2017. [Consulta: 26 septiembre 2018.]. Disponible en: <http://fichas.infojardin.com/condimentos/melissa-officinalis-melisa-toronjil-hierba-limon-citronela.htm>.

LIFEDER. *Benzodiacepinas: Mecanismo de Acción, Características y Efectos*. [En línea]. 2017. [Consulta: 15 diciembre 2018.]. Disponible en: <https://www.lifeder.com/benzodiacepinas/>

López, S. *Toronjil (Melissa officinalis)*. [En línea]. 2008. [Consulta: 22 noviembre 2018.]. Disponible en: <http://www.visionchamanica.com/Plantas/toronjil.htm>

Martínez, L; et al. *Familia Lamiaceae*. *Revista mexicana de biodiversidad*, 84(1), 2013. pp. 2-3.

Martínez, M. & López, D. “*Trastornos de ansiedad*”, *Revista Neurología, Neurocirugía y Psiquiatría*, [En línea]. España. 2011. 44(3), pp. 1–10. [Consulta: 22 noviembre 2018.]. Disponible en: [10.1016/S0212-5382\(07\)70931-7](https://doi.org/10.1016/S0212-5382(07)70931-7)

Mayo Clinic. *Ansiedad, descripción General*. [En línea]. 2017. [Consulta: 15 diciembre 2018.]. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/anxiety/symptoms-causes/syc-20350961>.

MHT. *Melissa officinalis L.* [En línea]. 2013. [Consulta: 17 Julio 2018.]. Disponible en: <http://www.minsal.cl/portal/url/item/7d9a8480e0891613e04001011e01021b.pdf>

MIRANDA, Migdalia. *Métodos De Análisis De Drogas Y Extractos*. [En línea]. 2002. pp. 1-26. [Consulta: 18 octubre 2018.]. Disponible en: file:///C:/Users/HP/Desktop/paper/miranda%20vdocuments.site_metodos-de-analisis-de-drogas-y-extractos-de-dra-migdalia-miranda-martinez.pdf

Navas, A., & Vargas, T. *Trastornos De Ansiedad*. *Revista Médica De Costa Rica Y Centroamérica* Lxix, 1(2), 2012.p. 3.

Normas Ramales. *Normas Ramales para Drogas Crudas y Extractos y Tinturas*. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP. 1992.

Orfila, G., & Farina, H. *Lamiaceae*. [En línea]. 2012. pp. 9. [Consulta: 26 noviembre 2018.]. Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/biblio/herbario/flora/vol4/pdf/2.%20LAMIACEAE.pdf>

Palacios, L. *Farmacognosia*. [En línea]. 2018. [Consulta: 17 noviembre 2018.]. Disponible en: <https://farmacognosia-farmacialadech.com/>

Pastrana, I. *Trastornos de ansiedad y estrés*. Madrid. [En línea]. 2012. [Consulta: 22 noviembre 2018.]. Disponible en: www.fundacionlopezibor.es

Pérez & González. *Plantas medicinales*. [En línea]. 2015. 1(2), pp. 70-71. [Consulta: 22 noviembre 2018.]. Disponible en: https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/66_3/PDF/Ansiedad.pdf.

Polanco, L. *Modelos animales: Una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad*. [En línea]. 2011. [Consulta: 03 diciembre 2018.]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/sumps/v18n2/v18n2a11.pdf>

Psicología Eficaz, 2018. *Modelos Animales En Psicología: Test De Campo Abierto*. [En línea]. 2018. [Consulta: 15 noviembre 2018.]. Disponible en: <https://psicologiaeficaznl.wordpress.com/2015/11/20/modelos-animales-en-psicologia-test-de-campo-abierto/>

Ramón, J; et al. “*Fitoterapia y sus aplicaciones*”. *Revista Española de Podología*, 22(6), España. 2015. pp. 258–267.

Renobales & Sallés. *LAMIACEAE*. [En línea]. 2011. pp. 1. [Consulta: 15 diciembre 2018.]. Disponible en: <https://www.ehu.eus/documents/1686888/3913390/53.+Melissa+officinalis.pdf>.

Reyes, A. *Trastornos De Ansiedad Guía Práctica Para Diagnóstico Y Tratamiento.* [En línea]. Honduras. 2018. [Consulta: 06 noviembre 2018.]. Disponible en: <http://www.bvs.hn/Honduras/pdf/TrastornoAnsiedad.pdf>

Robledo, P. *Trastornos de la ansiedad.* [En línea]. 2018. pp. 1. [Consulta: 11 noviembre 2018.]. Disponible en: https://as.com/deportevida/2018/05/15/portada/1526394147_185549.html

Rodríguez, P & Morán, M. *Estandarización De Los Parámetros De Calidad De La Tintura De Itamo Real 20 %.* [En línea]. España. 2008. [Consulta: 23 octubre 2018.]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543713003>

Salud es posible. *Toronjil o Melisa: Conoce sus beneficios y propiedades para la salud.* [En línea]. 2018. [Consulta: 03 octubre 2018.]. Disponible en: <https://saludesposible.com/beneficios-del-toronjil-melisa/>

Shakeri, A & Sahebkar, A. *Melissa officinalis L. – A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology.* [En línea]. PubMed. 2016. pp. 5-10. [Consulta: 06 diciembre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27167460>

Spiridon et al., 2011. *Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania.* [En línea]. 2011. pp. 7-5. [Consulta: 12 noviembre 2018]. Disponible en: <file:///C:/Users/HP/Desktop/paperee.pdf>

Takao, R. & Miyakawa, L. *Luz / oscuridad de transición de prueba para ratones.* [En línea]. 2006. pp.11-15. [Consulta: 25 noviembre 2018]. Disponible en: Available at: <https://www.jove.com/video/104/luz-oscuridad-de-transicin-de-prueba-para-ratones?language=Spanish>

Universidad Interamericana para el desarrollo. *Tamizaje y screening fitoquímico.* [En línea]. 2016. [Consulta: 03 septiembre 2018]. Disponible en: http://www.academia.edu/25502053/TAMIZAJE_FITOQUIMICO

Universidad de Valencia, S.F. *Labiatae (Lamiaceae).* [En línea]. 2015. pp. 22. [Consulta: 17 septiembre 2018]. Disponible en: <http://herbarivirtual.uib.es/cas-uv/familia/1802.html>

Vázquez, E. *Actividades biológicas de extractos.* [En línea]. 2015. pp. 5-8. [Consulta: 17 Julio 2018.]. Disponible en: <file:///C:/Users/SZ/Downloads/extractoplanta.pdf>

Virues, R. *Estudio sobre ansiedad.* [En línea]. 2005. pp. 6. [Consulta: 03 septiembre 2018]. Disponible en: <http://www.psicologiacientifica.com/ansiedad-estudio/>

Viviendo la salud. *Benzodiacepinas: qué son, usos, mecanismo de acción y tipos.* [En línea]. 2012. pp. 3. [Consulta: 22 noviembre 2018]. Disponible en: <https://viviendolasalud.com/medicamentos/benzodiacepinas>

World Health Organization. *Quality Control Methods For Herbal Materials.* [En línea]. 1998. [Consulta: 15 septiembre 2018]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/h1791e/h1791e.pdf>

Yancha, Gabriela. "*Comprobación de la actividad ansiolítica de Pataconyuyo (Peperomia peltigera c. dc.) in vivo en ratones (Mus musculus)*". [En línea] (tesis). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 2018. pp. 24-27. [Consulta: 14 diciembre 2018]. Disponible en: Available at: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/9017/1/56T00804.pdf>

ANEXOS

ANEXOS A: Preparación del material vegetal Toronjil (*Melissa officinalis*)



ANEXOS B: Control de calidad de la droga cruda





Gráfico 4 B: Determinación de Cenizas Solubles en agua



Gráfico 5 B: Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido clorhídrico

ANEXOS C: Tamizaje Fitoquímico



Gráfico 6 C: Extracto etéreo

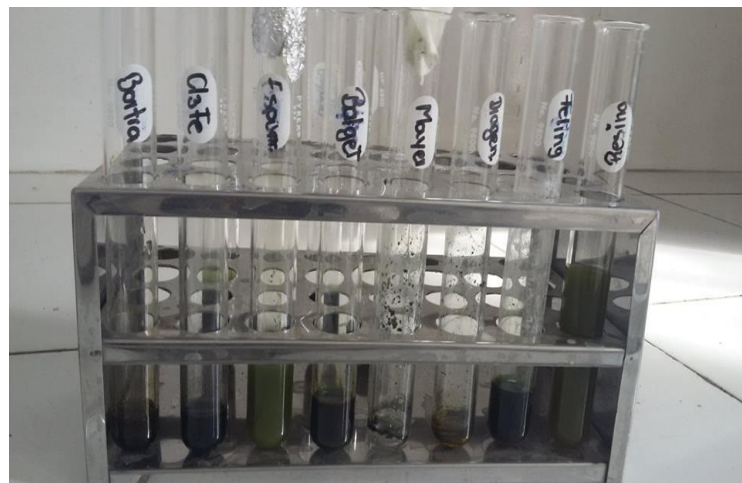


Gráfico 7 C: Extracto Hidroalcohólico



Gráfico 8 C: Extracto acuoso

ANEXOS D: Control de Calidad del Extracto Hidroalcohólico de Toronjil (*Melissa officinalis*)



Gráfico 9D:
Determinación de pH



Gráfico 10D: Índice de refracción



Gráfico 11D:
Determinación de Sólidos Totales

ANEXOS E: Obtención del extracto Hidroalcohólico de Toronjil (*Melissa officinalis*)



ANEXOS F: Cuantificación de Fenoles totales



ANEXOS G: Cuantificación de Flavonoides totales



ANEXOS H: Ambientación de los ratones (*Mus musculus*) en el Bioterio de la ESPOCH



ANEXOS I: Extracto Hidroalcohólico concentrado de *Melissa officinalis* reconstituido en propilenglicol al 15%.



ANEXOS J: Administración en ratones (*Mus musculus*)



Gráfico 20J: Administración para la determinación de la actividad ansiolítica.

ANEXOS K: Equipo electrónico para “Cuarto Claro Oscuro”



Gráfico 21K: Cuarto claro oscuro

ANEXOS L: Equipo electrónico para “Laberinto Elevado en Cruz”

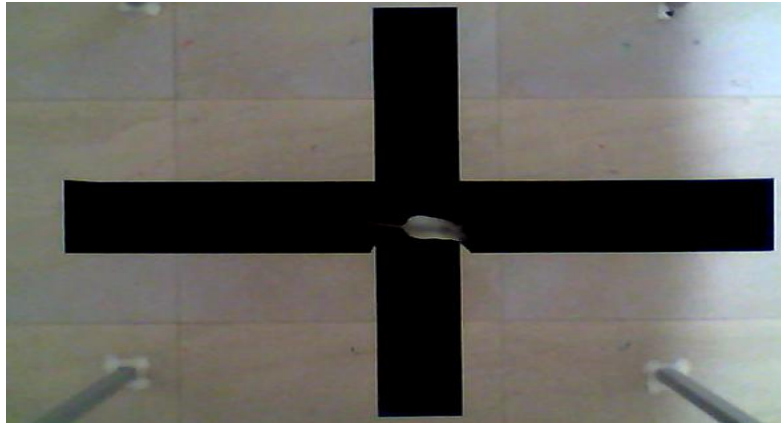



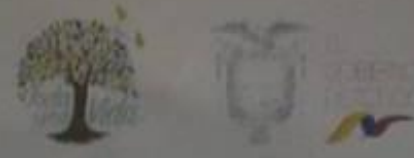
Gráfico 22L: Laberinto Elevado en Cruz

ANEXOS M: Equipo electrónico para “Campo Abierto”



Gráfico 23M: Campo Abierto

ANEXOS N: Permiso de Movilización de la planta

DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE TUNGURAHUA
UNIDAD DE PATRIMONIO NATURAL-VIDA SILVESTRE

ACTA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE VIDA SILVESTRE No. 29-2018-DPAT-V.S

En la ciudad de Ambato, a los 03 días del mes de DICIEMBRE del 2018, el Señor Edwin Lozada L. RESPONSABLE DE VIDA SILVESTRE - UNIDAD DE PATRIMONIO NATURAL EN TUNGURAHUA, autoriza al Señor(a) Gisela Alexandra Páez Bonilla con C.I. 0603914318 para que realice la movilización de los siguientes especímenes de flora silvestre.

FAMILIA	NOMBRE CIENTÍFICO	NÚMERO	SEXO	OBSERVACIONES
Lamiaceae	Melissa officinalis	3	-	Especímenes movilizados dentro del CONTRATO MARCO DE ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS DEL PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DENOMINADO "ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL EN EL USO SOSTENIBLE"
Total		3		

Los especímenes de flora silvestre se moviliza en calidad de:

Custodia temporal Investigación científica

Comercio

Taxidermia


Se moviliza desde: parroquia Pilaluta, cantón Ambato, provincia de Tungurahua.

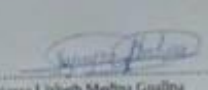
Hacia: Herbario Miguel Acosta Salas- Universidad Técnica de Ambato, cantón Cevallos, provincia de Tungurahua (para muestra).
 Y al Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela Politécnica de Chimborazo ESPOCH, ciudad de Babahoyo, cantón Chimborazo, (para muestra).

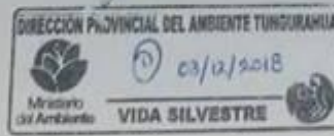
Fecha de movilización: Luzon, 03 diciembre, de 2018.

Vehículo: BUS COOP. CONDORIAZO placas: _____

Conducido por la Señorita: Yajayra Lizbeth Medina Gualpa C.I. 1904702890


 Edwin Lozada
 RESPONSABLE DE VIDA SILVESTRE TUNGURAHUA


 Yajayra Lizbeth Medina Gualpa
 RECIBO CONFORME



03/12/2018
VIDA SILVESTRE

Recibido 03-12-2018
Yajayra Medina

1

Tel.: 032 420066 / 032 420466 - Dir.: Antonio José de Sucre 09-74 y Guayaquil esquina / 7mo. Piso / Ambato - Ecuador

ANEXOS O: Identificación de *Melissa officinalis* por parte del Botánico.



Ambato, 29 de noviembre del 2018

Of. 05-AMAS-2018

Ing.
Pablo Pazmiño
DIRECTOR PROVINCIAL DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE DE TUNGURAHUA
Presente.-

De mis consideraciones:

Primeramente permítame saludarle y desearle éxitos en sus funciones que acertadamente desempeña en beneficio del medio ambiente de nuestro país. Por intermedio del presente me permito informar que la BQF. Gisela Pilco M.Sc. Directora del Proyecto "Evaluación de la actividad ansiolítica del extracto hidroalcohólico de las hojas de toronjil *Melissa officinalis* en ratones *Mus musculus*" realiza la entrega a través de sus estudiantes Yajayra Medina integrantes de su grupo de investigación de un duplicado de la siguiente colección botánica: a) *Melissa officinalis* al Herbario Ambato Misael Acosta Solís (AMAS) de la Universidad Técnica de Ambato. Material que se mantendrá bajo la custodia de nuestra institución.

Sin otro particular, agradezco y suscribo.

Atentamente,

Ph.D. José Homero Vargas López
CURADOR HERBARIO (AMAS)

