



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

"EVALUACIÓN COMPARATIVA DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS Y FLORES DE *Passiflora ligularis* y *Passiflora mixta* POR ADMINISTRACIÓN ORAL EN RATONES *Mus musculus*"

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: GISELLA CAROLINA BALSECA CHÁVEZ

TUTOR: BQF. DIEGO VINUEZA, M.Sc.

Riobamba-Ecuador

2016

©2016, Gisella Carolina Balseca Chávez

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 del Trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación: "EVALUACIÓN COMPARATIVA DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS Y FLORES DE *Passiflora ligularis* y *Passiflora mixta* POR ADMINISTRACIÓN ORAL EN RATONES *Mus musculus*", de responsabilidad de la señorita Gisella Carolina Balseca Chávez, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
BQF. Diego Vinueza, M.Sc. DIRECTOR DE TESIS	_____	_____
Dra. Susana Abdo, M.Sc. MIEMBRO DEL TRIBUNAL	_____	_____
BQF, Gisela Pilco M.Sc. DELEGADA DEL DECANO	_____	_____
DOCUMENTALISTA SISBIB ESPOCH	_____	_____
NOTA TRABAJO ESCRITO	_____	

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Gisella Carolina Balseca Chávez, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación

Riobamba 27 de octubre del 2016

GISELLA CAROLINA BALSECA CHÁVEZ

060404971-8

DEDICATORIA

A Dios por ser el motor de mi vida, por darme sabiduría y ser mi guía para enfrentar los problemas que se presentaron durante el trayecto para la culminación de esta meta.

A mis padres que son el pilar fundamental de mi vida quienes han creído y confiado en mí, especialmente a mi mami ya que gracias a su apoyo y perseverancia durante toda esta etapa de mi vida llegue a lograr mi meta, a mi hermano por brindarme su apoyo y compañía durante esta etapa de mi vida.

A mi hija Camilita la razón de mi vida y por quién sigo adelante cumpliendo todos mis sueños.

A ti Fabri M por ser alguien especial en mi vida y caminar a mi lado siempre.

Gisella

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo que fue mi segundo hogar permitiendo mi formación académica,

Mi más sincero agradecimiento a mi tutor BQF Diego Vinueza por sus conocimientos y ayuda impartida durante el transcurso de mi trabajo de titulación, gracias por sus palabras de aliento para no decaer ante las dificultades que se presentaron.

A la Dra Susana Abdo una profesional admirable de quien me llevo grandes conocimientos, gracias por su ayuda brindada en la culminación de este trabajo.

A mis amigos quienes estuvieron a mi lado durante todo este trayecto brindándome su apoyo, ánimo y compañía, por hacer de ésta etapa de vida algo inolvidable.

Nunca dejaré de agradecer a mi familia y a Dios por darme su apoyo y ayuda cuando más los necesitaba sin ustedes este logro no hubiera sido posible.

Gisella

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1 Marco Filosófico o epistemológico de la investigación	3
1.2 Antecedentes de la Investigación	3
1.3 Bases teóricas	5
1.3.1 Género Passiflora	5
1.3.1.1 <i>Composición química de la familia Passifloraceae</i>	5
1.3.1.2 <i>Flavonoides más importantes presentes en Passiflora</i>	6
1.3.1.3 <i>Propiedades farmacológicas</i>	7
1.3.1.4 <i>División Taxonómica</i>	8
1.3.2 Passiflora mixta	8
1.3.2.1 <i>Distribución geográfica</i>	8
1.3.2.2 <i>Propiedades terapéuticas</i>	9
1.3.3 Passiflora ligularis	9
1.3.3.1 <i>Distribución geográfica</i>	9
1.3.3.2 <i>Propiedades terapéuticas</i>	10
1.3.4 Ansiedad	10
1.3.4.1 <i>Causas de la Ansiedad</i>	11
1.3.4.2 <i>Síntomas de la Ansiedad</i>	12
1.3.5 Tipos de Trastornos de Ansiedad	13
1.3.5.1 <i>Trastorno de Pánico</i>	13
1.3.5.2 <i>Trastorno Obsesivo – Compulsivo (TOC)</i>	14
1.3.5.3 <i>Trastorno de Estrés Postraumático (TEPT)</i>	15
1.3.5.4 <i>Trastorno de Ansiedad Generalizada (TAG)</i>	16
1.3.6 Tratamiento de la Ansiedad	17

1.3.6.1	<i>Medicación</i>	17
1.3.6.2	<i>Antidepresivos</i>	18
1.3.8.3	<i>Farmacodinámica</i>	21
1.3.8.4	<i>Contraindicaciones</i>	22
1.3.8.5	<i>Reacciones adversas</i>	22
1.3.8.6	<i>Tratamiento</i>	23
1.3.9	<i>Modelos animales para el estudio de la Ansiedad</i>	23
1.3.9.1	<i>Modelo de respuesta Condicionado</i>	24
1.3.9.2	<i>Modelo de respuesta no Condicionado</i>	25
1.3.10	<i>Mus musculus</i>	25
1.3.10.1	<i>Clasificación Taxonómica</i>	26
1.3.10.2	<i>Características generales</i>	26
1.3.10.3	<i>Comportamiento</i>	27
 CAPITULO II		
2.	MARCO METODOLÓGICO	28
2.1	Lugar de investigación	28
2.2	Recolección del Material vegetal	28
2.3	Identificación botánica	28
2.4	Secado y molienda	28
2.5	Elaboración del extracto	29
2.6	Cálculos de la dosis a administrar	32
2.6.1	<i>Control</i>	33
2.6.2	<i>Extractos</i>	33
2.7	Evaluación de la actividad ansiolítica	33
2.7.1	<i>Ensayo de Campo Abierto (OFT)</i>	34
2.7.2	<i>Laberinto en Cruz Elevado (EMP)</i>	35
2.7.3	<i>Cuarto Claro y Oscuro</i>	35
2.7.4	<i>Prueba de la Chimenea</i>	35
2.8	Evaluación de la toxicidad en <i>Artemia salina</i>	36

2.9	Materiales y Equipos	37
CAPÍTULO III		
3	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS	38
3.1	Evaluación de la Actividad Ansiolítica	38
3.1.1	Ensayo de Laberinto Elevado en Cruz (EPM)	39
3.1.1.1	<i>Análisis del promedio y desviación estándar en relación al tiempo de permanencia en los brazos abiertos del dispositivo (laberinto elevado en cruz).</i>	39
3.1.1.2	<i>Discusión de resultados</i>	40
3.1.2	Ensayo de Campo Abierto (OFT)	40
3.1.2.1	<i>Análisis del promedio y desviación estándar al tiempo de permanencia en el centro del modelo del dispositivo (campo abierto)</i>	40
3.1.2.2	<i>Discusión de resultados</i>	41
3.1.3	Prueba cuarto claro/oscurο	42
3.1.3.2	<i>Discusión de resultados</i>	43
3.1.4	Prueba de la Chimenea	43
3.1.4.1	<i>Análisis de promedio y desviación estándar del tiempo que tarda en salir el ratón de retro de un tubo de 20 cm de longitud</i>	43
3.1.4.2	<i>Discusión de resultados</i>	44
3.2	Toxicidad en Artemia salina	45
3.2.1	Determinación de la toxicidad mediante Artemia salina.	45
3.2.2	Discusión de resultados	45
CONCLUSIONES		46
RECOMENDACIONES		47
GLOSARIO		
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1 Especies de <i>Passiflora</i>	6
Tabla 2-1 Taxonomía del Género <i>Passiflora</i>	8
Tabla 3-1 Clasificación de los TA (Trastornos de Ansiedad)	11
Tabla 4-1 Síntomas de la ansiedad	12
Tabla 5-1 Pruebas de mayor uso para evaluar ansiedad.....	24
Tabla 6-1 Clasificación taxonómica del ratón (<i>Mus musculus</i>).	26
Tabla 1-2 Descripción de los grupos formados para la administración de extractos.....	34
Tabla 2-2 Equipos y materiales usados para la parte práctica.....	37
Tabla 1-3 Laberinto elevado, <i>P. ligularis</i>	39
Tabla 2-3 Laberinto elevado, <i>P. mixta</i>	39
Tabla 3-3 Campo abierto, <i>P. ligularis</i>	40
Tabla 4-3 Campo abierto, <i>P. mixta</i>	41
Tabla 5-3 Cuarto claro, <i>P. ligularis</i>	42
Tabla 6-3 Cuarto claro, <i>P. mixta</i>	42
Tabla 7-3 Prueba de la Chimenea, <i>P. ligularis</i>	43
Tabla 8-3 Prueba de la Chimenea, <i>P. mixta</i>	44
Tabla 9-3 Cantidad total de <i>Artemia salina</i> que viven después de 24 horas de exposición al extracto.....	45

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-1 Estructuras de flavonoides más importantes de la familia Passifloraceae.....	7
Gráfico 2-1 <i>Passiflora mixta</i>	8
Gráfico 3-1 <i>Passiflora ligularis</i>	9
Gráfico 4-1 Ansiedad	11
Gráfico 5-1 Inicio y desarrollo del TAG	14
Gráfico 6-1 Tratamiento farmacológico del TAG	17
Gráfico 7-1 Ratón <i>Mus musculus</i>	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-2 Esquema de elaboración del extracto de acetato de etilo.	30
Figura 2-2 Esquema de elaboración del extracto metanólico.	31
Figura 3-2 Esquema de elaboración del extracto acuoso.	32
Figura 1-3 Efecto de los diferentes extractos reconstituidos en propilenglicol de <i>Passiflora ligularis</i> y <i>Passiflora mixta</i> , evaluado en el modelo EPM.	39
Figura 2-3 Efecto de los diferentes extractos reconstituidos en propilenglicol de <i>Passiflora ligularis</i> y <i>Passiflora mixta</i> , evaluado en el modelo campo abierto (OFT).	41
Figura 3-3 Efecto de los diferentes extractos reconstituidos en propilenglicol de <i>Passiflora ligularis</i> y <i>Passiflora mixta</i> , evaluado en el cuarto claro.	42
Figura 4-3 Efecto de los diferentes extractos reconstituidos en propilenglicol de <i>Passiflora ligularis</i> y <i>Passiflora mixta</i> , evaluado mediante la prueba de Chimenea.	44

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A Recolección de la materia vegetal

Anexo B Secado de la materia vegetal

Anexo C Elaboración d extractos con el primer solvente. (Acetato de etilo)

Anexo D Secado del residuo del primer extracto, para la elaboración del siguiente extracto

Anexo E Sonicación de los diferentes extractos

Anexo F Concentración de extractos en el sistema rotavapor

Anexo G Vehiculización de los extractos con propilenglicon al 15%

Anexo H Administración de 50mg/kg de extracto al ratón *Mus musculus*

Anexo I Determinación de la ansiedad en el modelo animal de laberinto en cruz elevado (EPM)

Anexo J Determinación de la ansiedad en el modelo animal OFT o ensayo de campo abierto

Anexo K Exposición de *Artemia salina* a los extractos

Anexo L Conteo de *Artemia salina* después de 24 horas de exposición a los extractos para la determinación de toxicidad

Anexo M Análisis de varianza del tiempo total de permanencia en los brazos abiertos

Anexo N Análisis de varianza del tiempo total de permanencia en el centro del modelo

Anexo O Análisis de varianza del tiempo total de permanencia en el cuarto claro

Anexo P Análisis de la varianza de tiempo que tarda en salir el ratón de retro de un tubo de

Anexo Q Cantidad de *Artemia salina* que viven después de 24 horas de exposición al extracto

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue determinar la actividad ansiolítica *in vivo* de los extractos de hojas y flores de *P. ligularis* y *P. mixta*, administrados por vía oral, utilizando ratones de laboratorio *Mus musculus* cepa BALB/c, y aplicando diferentes pruebas farmacológicas para el efecto ansiolítico. Se elaboró los extractos utilizando: acetato de etilo, metanol y agua; en una proporción de 10g de planta seca por 50mL de solvente. Los extractos se obtuvieron por maceración durante 24 horas; posteriormente, se sonicaron durante una hora, y se llevaron a sequedad. Para la evaluación de la actividad ansiolítica, cada extracto fue reconstituido con propilenglicol al 15% v/v. Estos fueron preparados a una concentración que garantizaba una dosis de 50mg/kg. Finalmente, se registraron las mediciones para cada individuo experimental, en cuatro pruebas farmacológicas: laberinto en cruz elevado (EPM), ensayo de campo abierto (OFT), cuarto claro/oscuro y actividad miorelajante. Se utilizó clonazepam como fármaco ansiolítico de referencia. Para evaluar la toxicidad de los extractos se realizó ensayos en *Artemia salina*. El extracto que presenta mayor toxicidad fue el extracto metanólico de flores de *P. mixta* dado que, su concentración letal media (LC₅₀), fue menor a los 10 ppm, mientras que el extracto que presentó mayor seguridad fue el de acetato de etilo de flores de *P. ligularis*, ya que su LC₅₀ fue de 797,00 ppm. Los resultados más significativos en cuanto a la actividad ansiolítica, fueron presentados por los extractos: metanólicos de flores de *P. ligularis* y *P. mixta* en el ensayo de Laberinto elevado, metanólico de hojas de *P. ligularis* en el ensayo de cuarto claro y oscuro y acuoso de flores de *P. ligularis* en la prueba de Chimenea. Se recomienda hacer un estudio utilizando diferentes dosis de los extractos, para determinar la dosis efectiva mínima que presenta una actividad ansiolítica significativa.

Palabras Clave: <TECNOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA INGENIERIA>, <BIOQUÍMICA Y FARMACIA>, <GRANADILLA (*Passiflora ligularis*)>, <CURUBA DE MONTE (*Passiflora mixta*)>, <RATONES (*Mus musculus*)>, <ANSIEDAD>, <LABERINTO EN CRUZ ELEVADO (EPM)>, <ENSAYO DE CAMPO ABIERTO (OFT)>.

ABSTRACT

The aim of the research was to determine the *in vivo* anxiolytic activity of the extracts of leaves and flowers of *P. ligularis* and *mixed P.*, administered orally, using laboratory mice *Mus musculus* strain BALB/c, and applying various pharmacological tests for this effect. It was prepared using extracts: ethyl acetate, methanol and water; in a ratio of 10g of dry parts by 50mL of solvent. The extracts were obtained by maceration for 24 hours; subsequently, they were sonicated for one hour, and taken to dryness. For evaluating the anxiolytic activity, each extract was reconstructed with propylene glycol 15% v/v. There were prepared at a concentration which guarantees a dose of 50mg/kg. Finally, experimental measurements for each individual were recorded in four pharmacological tests: elevated plus maze (EPM), open field test (OFT), four light/dark and muscle relaxant activity. Clonazepam used with reference anxiolytic drug. To evaluate the toxicity of the extracts it was performed test on *Artemia salina*. The extract was the most toxic methanol extract of *P. mixed* flowers because median lethal concentration (LC₅₀) was less than 10 ppm, while the extract was presented greater security ethyl acetate flowers *P. ligularis*, since its LC₅₀ was of 797. The most significant results in terms of anxiolytic activity were presented by extracts: methanolic flowers and *mixed P.*, *P. ligularis* in testing elevated plus maze, leaves methanolic of *P. ligularis* in the test four light and dark, watery *P. ligularis* flowers in the stack test. A study using different doses of extracts is recommended, to determine the minimum effective dose exhibiting a significant anxiolytic activity.

KEYWORDS: <TECHNOLOGY AND ENGINEERING SCIENCE>, <BIOCHEMISTRY AND PHARMACY>, <PASSION FRUIT (*Passiflora ligularis*)>, <CURUBA MOUNT (*mixed Passiflora*)>, <RATONS (*Mus musculus*)>, <ANXIETY>, <ELEVATED PLUS MAZE (EPM)>, <OPEN FIELD TRIAL (OFT)>.

INTRODUCCIÓN

Situación problemática

La ansiedad es el estado emocional de una persona, en el que siente intranquilidad y desesperación, al no alcanzar el resultado esperado de algún acontecimiento. La ansiedad es una respuesta normal del ser humano, siempre y cuando su intensidad, duración y frecuencia no sean excesivas. (Reyes, Ticas. 2005a, pp134)

Este tipo de trastorno es considerado uno de los problemas psiquiátricos de mayor frecuencia en personas y puede presentarse en determinadas etapas de su vida, pudiendo ser patológica cuando no hay ningún motivo específico. (Reyes, Ticas. 2005b, pp134)

Se conoce que a nivel mundial los trastornos por ansiedad se presentan en un 7%, considerando que un 6% abarca a pacientes hospitalizados. Estos trastornos presentan consecuencias graves como son impedimento de realizar actividades, pérdida de trabajo y gran dependencia económica afectando el estilo de vida de las personas. (Chan M. 2009, pp 29)

Mediante datos estadísticos obtenidos a partir de estudios recientes se ha logrado entender con mayor exactitud, el serio impacto con que los trastornos de ansiedad se presentan en gran parte de la población. Según Organización Mundial de la Salud (OMS) proporciona datos de que al menos 450 millones de personas presentan algún tipo de trastorno mental en el año. (Puchol & Esparza. 2003a, pp21)

Las personas con trastornos de ansiedad suelen tener preocupaciones excesivas, aunque no exista nada suficientemente importante que lo justifique. La intensidad de las preocupaciones puede llegar a bloquear la toma de decisiones cotidianas y a interferir de forma severa en la vida diaria. (Pastrana. 2007a, pp 1-10)

Físicamente, aparecen síntomas como dificultad para relajarse, concentrarse y para dormir. Todo esto tiende a facilitar la existencia de fatiga, dolores de cabeza, contracturas y tensión muscular elevada, síntomas inespecíficos digestivos, respiratorios o cardíacos. Para poder detectar el trastorno de ansiedad, es preciso que el paciente tenga estos síntomas durante un periodo superior a 6 meses. (Pastrana. 2007b, pp 1-10)

Consecuentemente, la ansiedad forma parte de uno de los problemas más graves de salud pública en la última década, y se ve aumentada en los países desarrollados con un mayor porcentaje que en los países en vías de desarrollo, es ahí donde se desencadena el uso de fármacos antidepresivos de origen químico, en el tratamiento de la ansiedad. Se emplean habitualmente dos tipos de fármacos: los ansiolíticos, y los antidepresivos. (Puchol & Esparza. 2003c, pp21)

El uso de las benzodiazepinas (BZ), se ha ido incrementando en los últimos años. Son los fármacos más utilizados en el ámbito médico para el tratamiento de los trastornos del ritmo sueño-vigilia y en los trastornos de ansiedad. Poseen serios efectos adversos, alteran la arquitectura del sueño, provocan tolerancia y dependencia, incoordinación motora y debilidad muscular y, a mediano y largo plazo altera funciones cognitivas tales como la memoria y la atención. (Pastrana. 2007b, pp 1-10)

Se analizan las posibles alternativas a éstas medicaciones que pueden dar una respuesta similar o mejorada sin los efectos adversos mencionados. Entre ellas encontramos a las medicinas naturales o fitoterapia. (Pastrana. 2007c, pp 1-10)

El uso de *Passiflora* como una medicina fue elogiado por primera vez en Perú en 1569. La información etnofarmacológica revela que *Passiflora edulis* ha sido utilizado en medicina tradicional en diversas partes del mundo. En Sudamérica, se bebe la infusión de hojas y flores como sedante. (Rojas J.2009a, pp 11-15)

Con estos fundamentos el propósito de ésta investigación es determinar si *Passiflora ligularis* y *Passiflora mixta*, presentan un efecto ansiolítico debido a que las dos plantas pertenecen a una misma familia y género, lo que hace suponer que los metabolitos secundarios sean similares y por ende los resultados en el estudio sean también similares al comportamiento animal frente a los trastornos psicósomáticos y así contribuir a la viabilidad de productos naturales que permitan combatir este tipo de trastornos del sistema nervioso central.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Marco Filosófico o epistemológico de la investigación

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

El trabajo de titulación tiene una metodología experimental, debido a que se estudia una parte de la ciencia de la cual se tienen pocos conocimientos y datos certeros como es la cuantificación de los compuestos que poseen *Passiflora ligularis* y *Passiflora mixta*, así como su efecto ansiolítico y la toxicidad que presentan. La metodología seguida es experimental, debido al manejo total sobre las variables dependientes.

Los resultados obtenidos de esta investigación tienen como finalidad ayudar a la población a que tenga una alternativa natural y con menos efectos adversos para tratar la ansiedad, contribuyendo así con el aprovechamiento de especies vegetales autóctonas del Ecuador.

1.2 Antecedentes de la Investigación

El término de ansiedad se usó por primera vez en el siglo XVIII, por el fisiólogo Escocés William Collen, para poder detallar una aflicción del sistema nervioso. En la antigüedad la ansiedad era llamada neurosis ansiosa, al pasar el tiempo fue denominada alteración por ansiedad. (Saucedo. 2012a, pp1-16)

Los trastornos de ansiedad son actualmente los desórdenes psiquiátricos de mayor prevalencia a nivel mundial y de acuerdo con la Food and Drug Administration (FDA), las benzodiacepinas (agonistas indirectos del receptor (GABA-A) son los fármacos de elección para el tratamiento de la ansiedad. Sin embargo, su consumo crónico produce tolerancia, dependencia y la interrupción brusca del tratamiento induce un síndrome de abstinencia. (Sollozo, Camarena, et al. 2011a, pp 80)

Es por esto que se ha incrementado la búsqueda y el desarrollo de fármacos con propiedades ansiolíticas con menor potencial para inducir reacciones adversas. Recientemente, en una encuesta realizada a personas que padecen este tipo de trastorno, se reportó el aumento en el uso de medicina alternativa. En este caso, se observó que ante un malestar emocional, el 52.5% del total de la muestra realizó alguna práctica de autocuidado y el 28.2% recurrió a sistemas alternativos. (Sollozo, Camarena, et al. 2011b, pp 80)

Dentro de las terapias alternativas destaca la medicina tradicional. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la medicina tradicional incluye todo medicamento fabricado a base de hierbas o preparados que contienen ingredientes activos de plantas, cuyo uso a través de los años ha sido ampliamente reconocido por su eficacia. El tratamiento de la enfermedad por medio de las propiedades curativas de las plantas fundamenta una ciencia conocida como fitomedicina. (Sollozo, Camarena, et al. 2011c, pp 80)

La OMS apoya el uso adecuado de medicamentos a base de plantas y promueve el uso de los recursos que se han demostrado ser seguros y eficaces. Algunas plantas medicinales han resistido la prueba científica, pero otros simplemente son utilizados por razones tradicionales para proteger, restaurar o mejorar la salud. La mayoría de las plantas medicinales todavía necesitan ser estudiadas desde una perspectiva científica; a pesar de la experiencia obtenida de su uso tradicional. (Rojas J.2009b, pp 11-15)

El género *Passiflora* (*P.*), pertenece a la familia Passifloraceae, cuenta con 18 géneros y alrededor de 630 especies distribuidas en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo, en América la mayoría de las especies se hallan en Centro y Sudamérica. Los extractos de *Passiflora* presentan varias actividades: ansiolítica, espasmolítica, hipnótica, sedante, narcótica y anticancerígena. (Rojas J.2009c, pp 11-15)

Dentro de las investigaciones sobre este género destaca la especie *P. incarnata* L., siendo la más investigada del género, sus extractos tienen propiedades sedantes en ratones, adicionalmente se

han aislado varios flavonoides que actúan sobre el sistema nervioso central (SNC). Algunos estudios demostraron efecto sedante, ansiolítico, ansiolítico sin alterar la actividad motora, ansiolítico sin alterar el proceso de memoria y calmante de tipo tranquilizante mayor. (Rojas J.2009d, pp 11-15)

Durante los últimos 50 años se ha desarrollado un gran número de pruebas en animales para identificar compuestos que potencialmente podrían presentar actividad ansiolítica. Además, se han utilizado agonistas, antagonistas o en combinación de aquellos receptores de los sistemas de neurotransmisores que participan en este proceso, para identificar el mecanismo neuronal por el cual logran este efecto. (Rojas J.2009e, pp 11-15)

El utilizar modelos de ansiedad con ratones, ofrece la ventaja de ensayar en ellos diversas técnicas experimentales que en los seres humanos no serían posible, se exploran extractos y alcaloides que se extraen de los diferentes órganos de las plantas, por lo regular dichas sustancias se obtienen en cantidades pequeñas y, el utilizar ratones permite el óptimo empleo de este recurso. (Rejón & Perdomo. 2010, pp5).

1.3 Bases teóricas

1.3.1 Género *Passiflora*

La *Passiflora* es el género más representativo de la familia Passifloraceae, son enredaderas que trepan por medio de zarcillos, aunque existen especies arbóreas o arbustivas. Tienen distribución tropical y comprenden 17 géneros y 660 especies. En América se encuentran representadas por cuatro géneros (*Ancistrothyrsus*, *Dilkea*, *Mitostemma* y *Passiflora*) y alrededor de 500 especies, la mayoría de ellas del género *Passiflora*. (Manuel J. 2000, pp 325)

1.3.1.1 Composición química de la familia Passifloraceae

Los análisis realizados del género pasiflora indica que contiene como productos químicos activos principales: alcaloides, fenoles, flavonoides glicosilados y compuestos cianogénicos. Entre los principales flavonoides se encuentra: apigenina, luteolina, quercetina, kaempferol, vitexina, isovitexina, orientinayrutina. Además contiene alcaloides indólicos simples que se encuentran basados en un sistema de anillos β -carbolínicos como: harmano, harmol, harmina, harmalol y harmalina. (Dhawan, Sharma, et al. 2004, pp 23)

Tabla 1-1 Especies de *Passiflora*

ESPECIE	FITOCOSTITUYENTE
<i>Passifloraincarnata</i>	Los mayores fitoconstituyentes son flavonoides, entre los que se incluyen: Apigenina, luteolina, quercetina, kaempferol; además de C-glicosil flavonoides como vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina, schaftosido, isoschaftosido, isovitexina-2-O-glucopiranosido, isoorientina-2-O-gluco-piranosido. Contiene además alcaloides indólicos simples basados en un sistema de anillos carbolínicos como harmano, harmol, harmina, harmalol y harmalina
<i>Passifloraedulis</i>	Glicósidosflavónicos como: luteolina-6-C-chinovosido, luteolina-6-C-fucoside, ciclopentanoidcianohidringlicosidospassicapsina y passibiflorina. Fenoles como 4-Hydroxy- β -ionol, 4-oxo- β -ionol, 4-hydroxy-7,8- dihydro- α -ionol, 4-oxo-7,8-dihydro- α -ionol. Alcaloidescomoharmano, harmina, harmalina y harmalol
<i>Passifloraalata</i>	C-glicosil flavonoides 2-xilosilvitexina y pequeñas cantidades de vitexina, isovitexina y orientina
<i>Passifloraquadrangularis</i>	Passiflorina, Triterpeneglycosidoquadrangulosido, ácido oleanólico-3- fosforoso Monoterpenoides como (2E)-2,6-dimetil-2,5áciso heptadienóico, (2E)-2,6 dimetil-2,5 ácido heptadienoico- β -D-glucopiranosilester, (5E)-2,6-dimetil-5,7-octadieno-2,3-diol.

Fuente: (Dhawan, Sharma, et al. 2004, pp 23)

1.3.1.2 Flavonoides más importantes presentes en *Passiflora*

Apigenina: es un flavonoide natural presente en las frutas y las verduras. Está reconocido como un flavonoide bioactivo que posee propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antiansiogénicas, antialergizantes, antigenotóxicas y anticancerosas. Los estudios epidemiológicos sugieren que una alimentación rica en flavona reduciría el riesgo de determinados cánceres, en particular los de mama, tubo digestivo, piel y próstata. Se ha sugerido que la apigenina tendría una acción protectora en otras enfermedades en las que se produce un proceso oxidativo, como los trastornos cardiovasculares y neurológicos. (Abu, Pelling, et al. 2008, pp 65)

Luteolina: cuando se compara con otros 27 flavonoides la luteolina tiene la mejor protección contra la agresión de nuestro ADN inhibiendo su daño oxidativo. (Abu, Pelling, et al. 2008, pp 65)

Quercetina: es uno de los flavonoides más ampliamente difundido entre los alimentos utilizados por el ser humano. Tiene numerosos efectos beneficiosos para la salud humana, incluyendo actividad antitumoral, protección cardiovascular, prevención de las cataratas, efectos antihipertensivos. (Pérez, Osuna, et al. 2009, pp 67-75)

Vitexina: es un glicósido flavonoide que se encuentra en ciertas hierbas, incluyendo la hierba de espino. La vitexina y sus derivados inducen la apoptosis y suprimen el crecimiento de tumores.

Isovitexina: es una flavona, la apigenina - 6 -C- glucósido.

Orientina: es la 8-C -glucósido de luteolina.

Iso-orientina: Es la luteolina-6-C-glucósido (Pérez, Osuna, et al. 2009, pp 67-75)

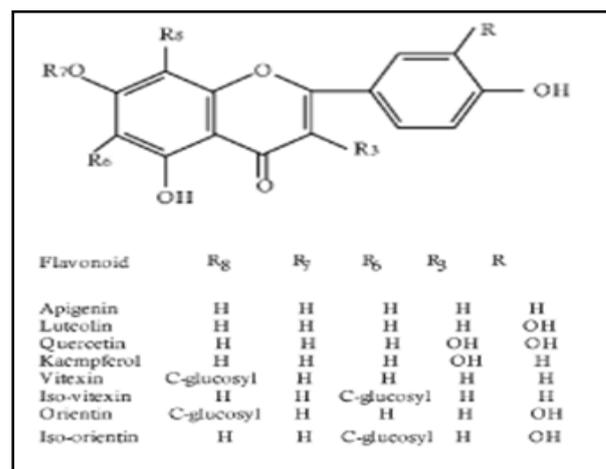


Gráfico 1-1 Estructuras de flavonoides más importantes de la familia Passifloraceae

Fuente: (Dhawan, Sharma, et al. 2004, pp 23)

1.3.1.3 Propiedades farmacológicas

La *Passiflora* se ha utilizado tradicionalmente como hierba calmante para la ansiedad, el insomnio, convulsiones y la histeria. Todavía se utiliza hoy en día para tratar la ansiedad y el

insomnio. Los científicos creen que el efecto de *Passiflora* se produce mediante un aumento de los niveles de ácido gamma aminobutírico (GABA) en el cerebro. El GABA reduce la actividad de algunas células del cerebro, haciendo que el individuo se sienta más relajado. (Steven & Ehrlich. 2014, pp 11)

1.3.1.4 División Taxonómica

Tabla 2-1 Taxonomía del Género *Passiflora*

TAXONOMÍA	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malpighiales
Familia	Passifloraceae
Género	<i>Passiflora</i>

Fuente: (Dhawan, Sharma, et al. 2004, pp 23)

1.3.2 *Passiflora mixta*



Gráfico 2-1 *Passiflora mixta*

Fuente: (Asturizaga, Balslev. 2006, pp 46)

1.3.2.1 Distribución geográfica

Es nativa de los Andes, se extiende desde Venezuela hasta Bolivia, entre 1.700 m y 3.700 m.s.n.m. Es una planta trepadora con hojas trilobadas y coriáceas. Los frutos tiene pericarpio coriáceo y son muy variables en tamaño y características de la pulpa. Esta especie es

considerada como un importante recurso para la reproducción del tumbo. (Asturizaga, Balslev. 2006, pp 46)

1.3.2.2 *Propiedades terapéuticas*

Entre las propiedades terapéuticas que presenta la *P. mixta* es su acción antiespasmódica, diurético, diaforético y es útil en casos de presión arterial alta y de fiebre. Es recomendable para personas con problemas estomacales e intestinales. (Tobergte& Curtis. 2013a, pp 1689-1699)

La *P. mixta* es una gran ayuda para disminuir el estrés, eliminar líquidos acumulados en el organismo, sedar e inducir el sueño y reducir la tensión arterial y la ansiedad. Si cueces hojas de *P. mixta* puedes emplearlas en dolores de cabeza y para tratar afecciones hepáticas y de riñón. (Tobergte& Curtis. 2013b, pp 1689-1699)

1.3.3 *Passiflora ligularis*



Gráfico 3-1 *Passiflora ligularis*
Fuente: (Tobergte & Curtis. 2013c, pp 1689)

1.3.3.1 *Distribución geográfica*

Especie de *Passiflora* subtropical más importante de las tierras altas de América tropical por encima de los 1.000 m. Es nativa y común desde Venezuela hasta Perú y Bolivia, crece silvestre y es cultivada comercialmente a través de esta región. (Asturizaga, Balslev. 2006a, pp 46)

Es una planta trepadora de tallos cilíndricos y glabros con hojas acorazonadas de color verde oscuro a casi azulado en el lado superior. Las flores son usualmente dos por nudo con brácteas ovales, foliosas y pétalos blanco rosados, filamentos de la corona con bandas alternas y transversales azules y blancas, los externos son iguales o más largos que los pétalos. (Asturizaga, Balslev. 2006b, pp 46)

1.3.3.2 *Propiedades terapéuticas*

Entre las propiedades terapéuticas más importantes de *P. ligularis* está su función como sedante, la misma que actúa a nivel del sistema nervioso controlando o previniendo las enfermedades nerviosas, también posee propiedades relajantes y calmantes, pudiendo ser utilizada para una crisis de nervios y contra el estrés. Tienen funciones en el aparato circulatorio contrarrestando afecciones en el mismo como la hipertensión arterial, lo que la convierte en útil para el corazón. (Carvajal, Restrepo. 2014a, pp 96- 185)

La especie *P. ligularis* es muy utilizada para la ansiedad, el insomnio, migraña, fatiga, taquicardia, vértigo. Uno de sus principales beneficios es que puede ser utilizada para luchar contra el síndrome de la abstinencia causado por alguna sustancia nociva que crea adicción. También se utiliza como antiespasmódico porque reduce los dolores ocasionados por cólicos intestinales. (Carvajal, Restrepo. 2014b, pp 96- 185)

1.3.4 *Ansiedad*

El término ansiedad proviene del latín *anxietas*, refiriendo un estado de agitación, inquietud o zozobra del ánimo, y suponiendo una de las sensaciones más frecuentes del ser humano, siendo ésta una emoción complicada y displacentera que se manifiesta mediante una tensión emocional acompañada de un correlato somático. En general, se dice que la ansiedad alude a la combinación de distintas manifestaciones físicas y mentales que no son atribuibles a peligros reales, sino que se manifiestan ya sea en forma de crisis o bien como un estado persistente y difuso. (Sierra, Zubeida, et al. 2003, pp 10-59)

Es importante entender la ansiedad como una sensación o un estado emocional en determinadas situaciones y que constituye una respuesta habitual a diferentes situaciones cotidianas estresantes. Así, cierto grado de ansiedad es incluso deseable para el manejo normal de las exigencias del día a día. Tan sólo cuando sobrepasa cierta intensidad o supera la capacidad adaptativa de la persona, es cuando la ansiedad se convierte en patológica, provocando malestar significativo. (Guía Práctica Clínica. 2008a, pp 15)



Gráfico 4-1 Ansiedad
Fuente:(Guía Práctica Clínica. 2008b, pp 15)

Existen criterios universales para los TA, los cuales se encuentran recogidos en las 2 clasificaciones de trastornos mentales más importantes

Tabla 3-1 Clasificación de los TA (Trastornos de Ansiedad)

Ansiedad Fisiológica	Ansiedad Patológica
<ul style="list-style-type: none"> • Mecanismo de defensa frente a amenazas de la vida diaria • Reactiva a una circunstancia ambiental Función adaptativa • Mejora nuestro rendimiento • Es más leve • Menor componente somático • No genera demanda de atención psiquiátrica 	<ul style="list-style-type: none"> • Puede bloquear una respuesta adecuada a la vida diaria • Desproporcionada al desencadenante • Función desadaptativa • Empeora el rendimiento • Es más grave • Mayor componente somático • Genera demanda de atención psiquiátrica

Fuente: (Ry Summa. 2012, pp 497)

1.3.4.1 Causas de la Ansiedad

Las causas de la ansiedad no son totalmente conocidas, pero están implicados tanto factores biológicos como ambientales y psicosociales.

Entre los factores biológicos se han encontrado alteraciones en los sistemas neurobiológicos gabaérgicos y serotoninérgicos, así como anomalías estructurales en el sistema límbico (córtex paralímbico), una de las regiones más afectadas del cerebro. Además, se han observado ciertas alteraciones físicas y una mayor frecuencia de uso y/o retirada de medicinas, alcohol, drogas, sedantes y otras sustancias. Por último, existe cierta predisposición genética en la aparición de estos trastornos. (Guía Práctica Clínica. 2008c, pp 15)

Entre los factores ambientales, el que tiene mayor influencia es el factor psicosocial y situaciones de estrés, el ambiente familiar, las experiencias amenazadoras de vida y las preocupaciones excesivas por temas cotidianos. Como factores predisponentes, se ha observado la influencia de las características de la personalidad. Parece ser que es la interacción de múltiples determinantes lo que favorece la aparición de estos trastornos de ansiedad; además, es muy común la comorbilidad con otros trastornos mentales como los trastornos del estado de ánimo. (Guía Práctica Clínica. 2008d, pp 15)

1.3.4.2 Síntomas de la Ansiedad

Los síntomas que se presentan en la ansiedad son muy variados, los mismos que se clasifican en cinco grupos: Físicos, psicológicos, de conducta, intelectuales o cognitivos y sociales como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 4-1 Síntomas de la ansiedad

Síntomas Físicos	Síntomas Psicológicos y Conductuales
Vegetativos: sudoración, sequedad de boca, mareo, inestabilidad	Preocupación, aprensión
Neuromusculares: temblor, tensión muscular, cefaleas, parestesias	Sensación de agobio
Cardiovasculares: palpitaciones, taquicardias, dolor precordial	Miedo a perder el control, a volverse loco o sensación de muerte inminente
Respiratorios: disnea	Dificultad de concentración, quejas de pérdida

de memoria	
Digestivos: náuseas, vómitos, dispepsia, diarrea, estreñimiento, meteorismo	Irritabilidad, inquietud, desasosiego, aerofagia,
Genitourinarios: micción frecuente, problemas de la esfera sexual	Conductas de evitación de determinadas situaciones
Inhibición o bloqueo psicomotor Obsesiones o compulsiones	

Fuente:(Guía Práctica Clínica. 2008c, pp 15)

1.3.5 Tipos de Trastornos de Ansiedad

Los trastornos de ansiedad ocurren comúnmente junto con otras enfermedades mentales o físicas, incluyendo abuso del consumo de alcohol o sustancias, lo cual puede enmascarar los síntomas de la ansiedad o empeorarlos. En algunos casos, estas otras enfermedades necesitan ser tratadas antes de que una persona pueda responder a un tratamiento para el trastorno de ansiedad. (Instituto Nacional Mental. 2009, pp 32)

1.3.5.1 Trastorno de Pánico

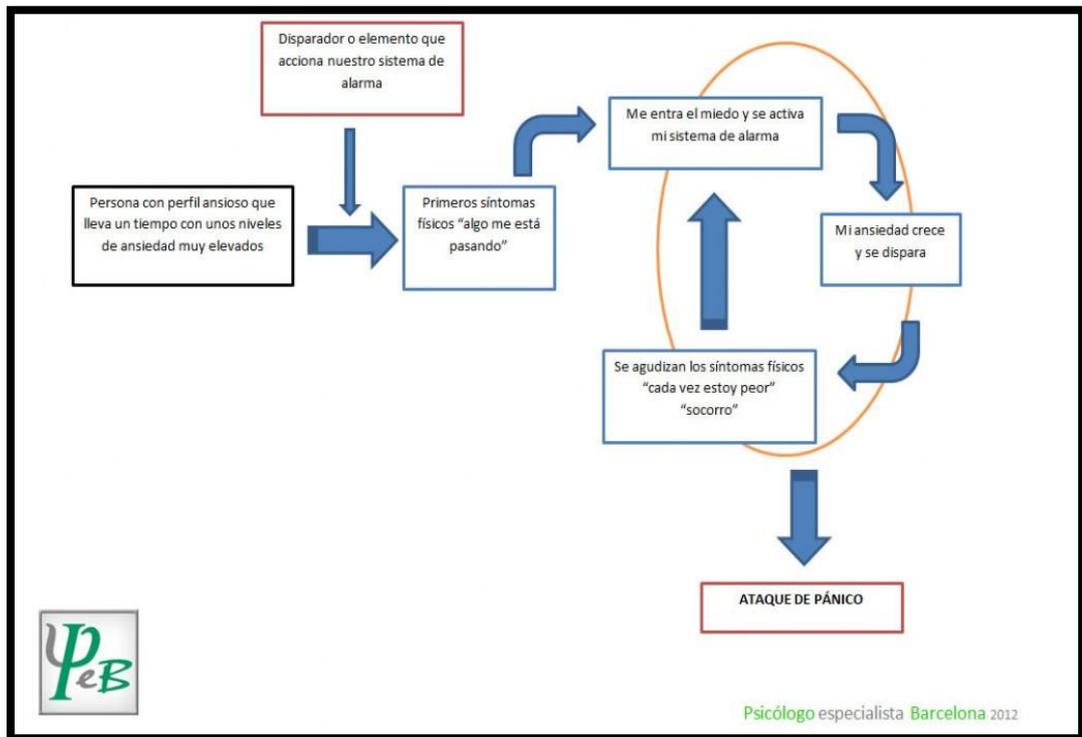
El trastorno de pánico se define por la repetición, más o menos frecuente, de ataques de pánico, algunos de los cuales son espontáneos, inesperados, es decir, no están favorecidos por un miedo previo y por una confrontación con una situación ansiógena, además, el diagnóstico de trastorno de pánico sólo se puede plantear si, tras el ataque, el paciente presenta durante al menos 1 mes un temor persistente a que se produzca un nuevo ataque, preocupaciones relativas a los riesgos asociados a dichos ataques(miedo a morir, a volverse loco, etc.) o, más generalmente, un cambio de comportamiento. (Pelissolo A. 2012a, pp 1-10)

Es una enfermedad real que se puede tratar satisfactoriamente. Se caracteriza por ataques repentinos de terror, usualmente acompañados por latidos fuertes del corazón, transpiración, debilidad, mareos, o desfallecimiento. Durante estos ataques, las personas con trastorno de pánico pueden acalorarse o sentir frío, sentir un hormigueo en las manos o sentir las adormecidas; y experimentar náuseas, dolor en el pecho, o sensaciones asfixiantes. Los ataques

de pánico usualmente producen una sensación de irrealidad, miedo a una fatalidad inminente, o miedo de perder el control. (Instituto Nacional Mental. 2009a, pp 32)

En el siguiente esquema se indica de una manera detalla el tratamiento farmacológico que se emplea para el Trastorno de Ansiedad Generalizada.

Gráfico 5-1 Inicio y desarrollo del TAG



Fuente:(Instituto Nacional Mental. 2009b, pp 32)

1.3.5.2 Trastorno Obsesivo – Compulsivo (TOC)

El TOC es una enfermedad caracterizada por pensamientos intrusivos y recurrentes (obsesiones) usualmente acompañados por conductas repetitivas sin aparente propósito (compulsiones), que el paciente reconoce como carentes de sentido y ego-distónicas. Las obsesiones son pensamientos, ideas o imágenes involuntarias y repetitivas que interrumpen en la actividad mental del individuo; el sujeto las percibe como inapropiadas y carentes de sentido y causan un malestar significativo. La persona reconoce que estos pensamientos son producto de su mente, es decir, son percibidos como pensamientos propios pero involuntarios, sintiéndose el sujeto incapaz de librarse de ellos. (Schalatter, Garrán, et al. 2011, pp 41)

Los TOC afectan aproximadamente a un 2-3% de los individuos, aparecen temprano en la vida, a menudo en la infancia, y tienden a evolucionar durante períodos muy largos. En algunos

pacientes pueden provocar una discapacidad considerable. Aún no se conocen bien las causas de los TOC, biológicas o psicológicas, pero se sabe tratarlos cada vez mejor, mediante las combinaciones de fármacos y de TCC. Las hipótesis biológicas actuales hacen intervenir un disfuncionamiento de los sistemas serotoninérgicos cerebrales, con una implicación probable de los núcleos grises centrales. (Pelissolo A. 2012b, pp 1-10)

Respecto a los factores genéticos, hay que destacar que el TOC aparece con mayor frecuencia en familiares de personas afectas que en familiares de controles o que en la población general. Los factores genéticos son probablemente el principal contribuyente a la aparición de esta patología, como se ha visto en la fuerte historia familiar de pacientes y en estudios con gemelos. (Schalatter, Garrán, et al. 2011, pp 41)

Las personas tienen pensamientos persistentes y perturbadores (obsesiones) y usan los rituales (compulsiones) para controlar la ansiedad producida por estos pensamientos. La mayoría de las veces, los rituales terminan controlando a esas personas. (Instituto Nacional Mental. 2009c, pp 32)

1.3.5.3 Trastorno de Estrés Postraumático (TEPT)

Éste tipo de enfermedad se desarrolla después de una experiencia aterrizante que involucra daño físico o la amenaza de daño físico. La persona que desarrolla el TEPT puede ser aquella que fue afectada, el daño puede haberle sucedido a una persona querida, o la persona puede haber sido testigo/a de un evento traumático que le sucedió a sus seres queridos o a desconocidos. Las personas con TEPT pueden asustarse con facilidad, paralizarse a nivel emocional (especialmente en relación con personas cercanas a ellas), perder interés en las cosas que acostumbraban disfrutar, tener problemas para mostrarse afectuosas, ponerse irritables, más agresivas, o incluso violentas. Tales personas evitan situaciones que les recuerdan el incidente original y los aniversarios del incidente son con frecuencia un momento muy difícil. Los síntomas del TEPT parecen empeorar cuando el evento que los provocó fue iniciado deliberadamente por otra persona, como en el caso de un asalto o secuestro. (Instituto Nacional Mental. 2009d, pp 32)

No todas las personas traumatizadas desarrollan un TEPT completamente desarrollado o incluso uno leve. Normalmente, los síntomas comienzan dentro de los tres meses luego del incidente, pero ocasionalmente pueden surgir varios años después. Los síntomas deben durar más de un mes para que se considere un caso de TEPT. La evolución de la enfermedad es variable. Algunas personas se pueden recuperar al cabo de seis meses, mientras que otras tienen síntomas

que perduran por mucho más tiempo. En algunas personas, la enfermedad se vuelve crónica. (Instituto Nacional Mental. 2009e, pp 32)

1.3.5.4 Trastorno de Ansiedad Generalizada (TAG)

La ansiedad generalizada o trastorno de ansiedad generalizada (TAG) corresponde a un estado de alerta y de inquietud casi continuo, asociado con signos psíquicos y físicos de tensión ansiosa, durante un período de al menos 6 meses. El término generalizada se debe a que, a diferencia de las fobias, no se trata de un miedo focalizado en un objeto o una situación precisa, sino de una tendencia a inquietarse por todo y por nada. Se estima que el TAG afecta a alrededor de un 3% de varones y un 6% de mujeres de la población general, en algún momento de su vida. Comienza habitualmente en medio de la edad adulta (en personas que en general tienen un temperamento ansioso) y constituye el trastorno de ansiedad más frecuente de las personas de edad. (Pelissolo A. 2012c, pp 1-10)

El TAG se diagnostica cuando una persona se preocupa excesivamente acerca de diversos problemas de la vida diaria durante por lo menos seis meses. Las personas con TAG parecen incapaces de liberarse de sus preocupaciones, a pesar de que usualmente son conscientes de que su ansiedad es más intensa de lo que amerita la situación. No se pueden relajar, se asustan con facilidad, y tienen dificultades para concentrarse, con frecuencia, tienen problemas para dormir o mantenerse dormidas. Los síntomas físicos que con frecuencia acompañan la ansiedad incluyen fatiga, dolores de cabeza, tensiones musculares, dolores musculares, dificultad para tragar, temblores, tics nerviosos, irritabilidad, transpiración, náuseas, mareos, necesidad de ir al baño con frecuencia, sensación de falta de aire, y repentinos acaloramientos. (Instituto Nacional Mental. 2009f, pp 32)

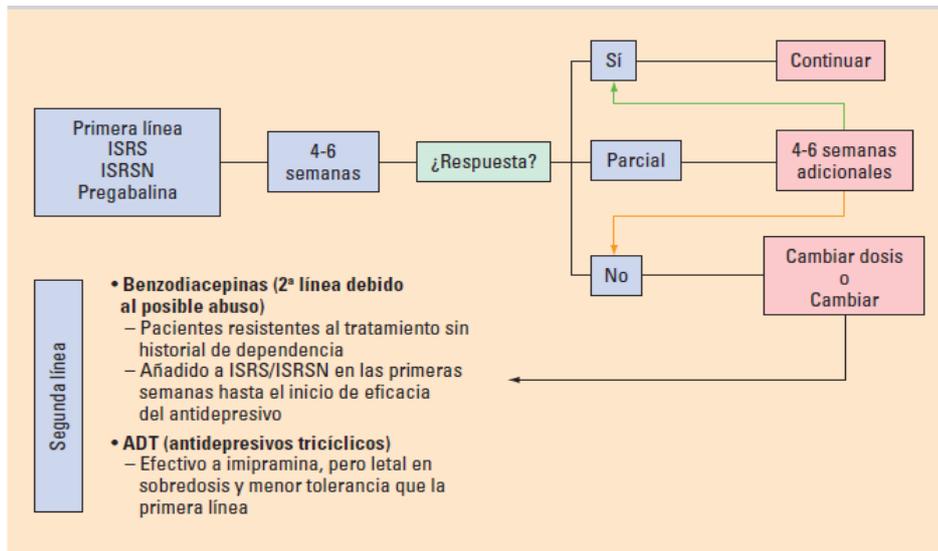


Gráfico 6-1 Tratamiento farmacológico del TAG

Fuente:(Navarro & Moreira. 2013a,PP 16)

1.3.6 *Tratamiento de la Ansiedad*

Los trastornos de ansiedad tienen tratamientos efectivos en la mayoría de los casos. Estos tratamientos llevan a normalizar la vida de forma satisfactoria. Lo más habitual es la combinación de tratamiento farmacológico, dirigido hacia los síntomas principales, y tratamiento psicoterapéutico, dirigido hacia las conductas y pensamientos que generan y mantienen la ansiedad. (Navarro & Moreira. 2013b, pp 16)

1.3.6.1 *Medicación*

La medicación no curará los trastornos de ansiedad, pero puede mantenerlos bajo control mientras la persona recibe psicoterapia, debe ser prescrita por médicos, usualmente psiquiatras, quienes pueden ofrecer psicoterapia o trabajar en equipo con psicólogos, trabajadores sociales, o consejeros. Las principales medicaciones usadas para los trastornos de ansiedad son antidepresivos, medicamentos ansiolíticos (pastillas para la ansiedad/nervios), y bloqueadores beta para controlar algunos de los síntomas físicos. Con un tratamiento apropiado, muchas personas con trastornos de ansiedad pueden vivir vidas normales y plenas. (Instituto Nacional Mental. 2009g, pp 32)

1.3.6.2 Antidepresivos

Los antidepresivos se desarrollaron para tratar la depresión, pero también son efectivos para los trastornos de ansiedad. Aunque estos medicamentos comienzan a alterar la química del cerebro desde la primera dosis, su efecto total requiere que ocurran una serie de cambios; usualmente toma entre 4 y 6 semanas para que los síntomas comiencen a desaparecer. Es importante continuar tomando estos medicamentos durante suficiente tiempo para permitirles que funcionen. (Instituto Nacional Mental. 2009g, pp 32)

1.3.6.3 Psicoterapia

La psicoterapia implica hablar con un profesional capacitado en la salud mental, tal como un psiquiatra, psicólogo, trabajador social, o consejero, para descubrir cuál fue la causa de un trastorno de ansiedad y cómo manejar sus síntomas. (Navarro & Moreira. 2013c, pp 17)

La atención primaria es la forma más simple y natural que se la conoce como psicoterapia de “apoyo” no consiste en otra cosa que la actitud de escucha con empatía con la que el terapeuta da valor a los sentimientos e ideas del paciente, y este puede expresar sus emociones y sentirse reconfortado reforzando su autonomía para superar el problema que le causa ansiedad. (Navarro & Moreira. 2013d, pp17)

1.3.7 *Neurotransmisores en la respuesta de la Ansiedad*

Al realizarse la síntesis de la neurona se secretan productos llamados neurotransmisores los mismos que ejercen su acción específica sobre el receptor específico al momento de ser liberados. Los receptores específicos se encuentran localizados en la membrana neuronal y pueden ubicarse tanto en otra neurona como en la propia neurona que los sintetiza. (Gonzales H. 2014, pp 240)

Los principales neurotransmisores relacionados con la ansiedad son el ácido gama aminobutírico (GABA), la noradrenalina y la serotonina. (Bobes, Gonzales, et al. 2010a, pp 38)

1.3.7.1 Ácido gama aminobutírico (GABA)

El GABA es un neurotransmisor ampliamente difundido por el sistema nervioso que está dotado de una acción inhibitoria sobre las sinapsis neuronales. El receptor específico del GABA, situado en la membrana neuronal, está asociado con un canal de cloro, de modo que cuando el GABA se une a su receptor, el canal de iones de cloro se abre, permitiendo la entrada de iones de cloro en la neurona, dando lugar a una hiperpolarización de la membrana y con ello a una disminución de la “excitabilidad” celular. El papel del GABA en los trastornos de ansiedad se apoya en la indiscutible eficacia de las benzodiazepinas en el tratamiento de los trastornos de ansiedad. (Bobes, Gonzales, et al. 2010b, pp 38)

Las benzodiazepinas ejercen su mecanismo de acción a través de su unión con un receptor específico unido tanto estructural como funcionalmente con el receptor del GABA, principalmente del subtipo GABA_A. Cuando las benzodiazepinas se unen a su receptor, la entrada de iones cloro mediada por el GABA se incrementa. El hecho de que exista en nuestro organismo un receptor al que se unen de un modo específico las benzodiazepinas hace suponer la existencia de alguna sustancia endógena, aún no descubierta capaz de fijarse a ese lugar y cuya alteración podría estar de alguna forma relacionada con la aparición de los trastornos de la ansiedad. (Bobes, Gonzales, et al. 2010c, pp 38)

Los mecanismos relacionados con el sistema GABAérgico parecen tener mayor importancia en los trastornos por ansiedad generalizada, por otra parte no hay que olvidar que el sistema GABA está íntimamente relacionado con otros sistemas de neurotransmisión cerebral, teniendo importantes conexiones con el *locus coeruleus* (núcleo original del sistema noradrenérgico) y con los núcleos del rafe (núcleo del sistema serotoninérgico). (Bobes, Gonzales, et al. 2010d, pp 38)

1.3.7.2 Noradrenalina

El sistema noradrenérgico es otro de los sistemas neuroquímicos claramente implicados en la neurobiología de la ansiedad. No en vano, el *locus coeruleus* (mayor núcleo noradrenérgico del sistema nervioso central) es considerado como el centro responsable de las reacciones de alerta del organismo, dado que la estimulación eléctrica de dicho núcleo en animales de experimentación, desencadena efectos similares a los producidos por un peligro real con manifestaciones conductuales relacionadas con el miedo y la ansiedad. Por el contrario, la ablación de dicho núcleo inhibe o bloquea completamente la capacidad de los animales para

emitir una respuesta de ese tipo. Por otra parte, estudios realizados en seres humanos ponen de manifiesto que en pacientes con trastorno de pánico, los agonistas β -adrenérgicos y los antagonistas α_2 -adrenérgicos pueden provocar crisis de angustia frecuentes y graves. De modo contrario, la clonidina (antagonista α_2 -adrenérgico) reduce los síntomas de ansiedad en algunas situaciones experimentales y terapéuticas, la actividad noradrenérgica en el sistema nervioso periférico está aumentada en los trastornos de ansiedad, y más particularmente en el trastorno de pánico, hecho que se ve avalado por datos procedentes de algunos estudios, aunque no todos, que muestran incrementos de los niveles plasmáticos y urinarios de catecolaminas y sus metabolitos. Si bien aún permanece como desconocido el hecho de si la actividad noradrenérgica incrementada es causa o consecuencia de la reacción normal de organismo frente a la ansiedad. (Gonzales H. 2014, pp 240)

1.3.7.3 Serotonina

El interés por la posible relación existente entre trastornos de ansiedad y serotonina vino inicialmente motivado por la observación de que los antidepresivos serotoninérgicos tenían efectos terapéuticos en algunos trastornos de ansiedad. Otros datos que apoyan la implicación de la serotonina provienen de la investigación psicofarmacológica, así, fármacos como la azaspironas, que son agonistas de receptores 5HT₁, tienen capacidad ansiolítica, otros fármacos antagonistas de receptores 5HT₂ y antagonistas de receptores 5HT₃ poseen también un potencial ansiolítico. (Bobes, Gonzales, et al. 2010e, pp 38)

1.3.8 Clonazepam

El clonazepam es una benzodiazepina agonista del receptor GABA que aumenta la frecuencia de apertura del receptor, produciendo un incremento de la recaptación de Cl por la neurona y una hiperpolarización neuronal. (De la Vega & Zambrano. 2010a, pp5)

1.3.8.1 Mecanismo de acción

Antiepiléptico, benzodiazepina de acción prolongada. Actúa como agonista de los receptores BZ (benzodiazepínicos) cerebrales, potenciando el efecto neurotransmisor inhibitor del GABA (gamma-aminobutírico), suprimiendo la propagación de la actividad convulsiva producida por un foco epiléptico, pero no inhibe la descarga normal del foco. (De la Vega & Zambrano. 2010b, pp5)

1.3.8.2 Farmacocinética

- **Absorción.** tras la ingestión de clonazepam, se absorbe de forma rápida y casi total. Las concentraciones plasmáticas máximas de clonazepam se alcanzan al cabo de 1-4. La biodisponibilidad absoluta por vía oral es del 90%. El tiempo de absorción medio es alrededor de 25 min. Las concentraciones plasmáticas en estado de equilibrio para un régimen de dosificación de una vez al día, son tres veces más altas que las alcanzadas después de una única dosis oral.
- **Distribución:** se distribuye muy rápidamente a los distintos órganos y tejidos con preferencia por la fijación a las estructuras cerebrales. El tiempo medio de distribución es de aproximadamente 0,5-1 hora. El volumen de distribución es de 3 l/kg. Su grado de fijación a proteínas es del 82-86%. (De la Vega & Zambrano. 2010c, pp5)
- **Metabolismo:** se metaboliza mayoritariamente por reducción a 7-amino-clonazepam y por N - acetilación a 7-acetamino-clonazepam. También se produce la hidroxilación del C-3. El citocromo hepático C-450 3A4 está implicado en la nitrorreducción del clonazepam a sus metabolitos farmacológicamente inactivos. En orina se excreta entre el 50-70% de la dosis y entre el 10-30% se elimina como metabolitos en las heces. El clonazepam no alterado que se excreta por la orina es generalmente menor al 2% de la dosis administrada. Los metabolitos presentes en la orina se encuentran tanto como compuestos libres y conjugados (glucurónido y sulfato).
- **Eliminación:** la media de la semivida de eliminación es de 30-40 horas. El aclaramiento es de 55 mL/min. La cinética de eliminación en niños es similar a la observada en adultos.(De la Vega & Zambrano. 2010d, pp5)

1.3.8.3 Farmacodinámica

El clonazepam posee todos los efectos farmacológicos característicos de las benzodiazepinas: anticonvulsivante, sedante, miorrelajante y ansiolítico. Al igual que sucede con las demás benzodiazepinas, se cree que tales efectos se deben fundamentalmente a la inhibición postsináptica mediada por el GABA; los estudios realizados con animales, no obstante, ponen de manifiesto además un efecto del clonazepam sobre la serotonina. De acuerdo con los datos obtenidos en animales y los estudios electro encéfalo gráficos (EEG) realizados en el ser humano, el clonazepam disminuye rápidamente muchos tipos de actividad paroxística: descargas de puntas y ondas en las crisis de ausencias típicas (pequeño mal), ondas y puntas lentas, ondas y puntas generalizadas, puntas de localización temporal o de otro tipo y ondas y puntas irregulares. (De la Vega & Zambrano. 2010e, pp5)

1.3.8.4 Contraindicaciones

El clonazepam puede producir un aumento de la salivación, lo cual debe ser tenido en cuenta en los pacientes con problemas obstructivos respiratorios o esofágicos

Debido a sus efectos depresores sobre el sistema nervioso central se debe advertir a los pacientes que el fármaco puede producir somnolencia e incapacidad para llevar a cabo tareas específicas. (Drac, Puppo, et al. 2010a, pp 1-27)

Los pacientes que consuman grandes cantidades de alcohol durante un tratamiento con clonazepam pueden experimentar una depresión respiratoria e incluso coma.

El clonazepam no se debe utilizar en pacientes con depresión respiratoria o en casos de shock o coma debido a que este fármaco ocasiona efectos depresores sobre la respiración y sobre el sistema nervioso central. Tampoco se debe utilizar en pacientes con enfermedades obstructivas respiratorias (EPOC) o con apnea del sueño y será administrado con precaución a pacientes que roncan regularmente. (Drac, Puppo, et al. 2010b, pp 1-27)

1.3.8.5 Reacciones adversas

La mayor parte de las reacciones adversas asociadas a los tratamientos con clonazepam son debidas a sus efectos sobre el sistema nervioso central, incluyendo jaquecas, somnolencia, ataxia, mareos, confusión, depresión, disartria, síncope, fatiga, temblores y vértigo. Con el tiempo, estos síntomas van atenuándose. (Drac, Puppo, et al. 2010c, pp 1-27)

Puede producirse una estimulación del sistema nervioso central incluyendo hostilidad, pesadillas, excitación, manías, temblores, euforia, alteraciones del sueño, espasticidad muscular, ataques de rabia e hiper reflexia. Estas reacciones son más frecuentes en los enfermos psiquiátricos y en los niños hiperactivos. En estos casos, es recomendable discontinuar el tratamiento con clonazepam. (Drac, Puppo, et al. 2010d, pp 1-27)

Otras reacciones adversas observadas con menor frecuencia, incluyen bradicardia, hipotensión, rash, urticaria, visión borrosa, diplopía, sofocos, constipación, náuseas y vómitos, disminución del lívido, disfunción hepática y dolor abdominal. (Drac, Puppo, et al. 2010e, pp 1-27)

1.3.8.6 *Tratamiento*

Administración oral

Adultos y adolescentes de > 30 kg: las dosis iniciales son de 1.5 mg/día distribuidos en tres tomas iguales. Esta dosis se pueden aumentar progresivamente con incrementos de 0.5 a 1 mg cada tres días hasta conseguir el control de las convulsiones. Las dosis máximas recomendadas no deben ser superiores a 20 mg/día. En general las dosis medias de mantenimiento oscilan entre 2 y 8 mg/día

Ancianos o pacientes debilitados: estos pacientes requieren unas menores dosis iniciales y un ajuste con incrementos de dosis más pequeños

Niños >10 años (> 30 kg): la dosis inicial debe ser de 0.01-0.03 mg/kg (sin exceder los 0.05 mg/kg/día) administrados en tres tomas iguales. En el caso de ser necesarias dosis más altas, utilizar incrementos de 0.25 a 0.5 mg/día cada 3 días, hasta llegar a un máximo de 0.1-0.2 mg/kg/día, siempre dividido en tres administraciones. (Drac, Puppo, et al. 2010f, pp 1-27)

1.3.9 *Modelos animales para el estudio de la Ansiedad*

Los modelos animales no humanos, han sido bastante manejados para explicar patologías, en especial la ansiedad, ya que cuentan con algunas ventajas como: tener control sobre el ambiente en que están los sujetos y de la historia conductual, se puede realizar una gran cantidad de manipulaciones experimentales que permiten evaluar la eficacia terapéutica de diferentes tratamientos y de manera que se pueda validar los modelos. Por ello señalan que los modelos animales para que se asemejen a las condiciones originales de los humanos deben contemplar diferencialmente la etiología, fisiología, sintomatología y su tratamiento, pero se debe salvaguardar el buen trato de las especies animales de acuerdo a las legislaciones que dictaminan el manejo y uso de animales de laboratorio en cuanto a restricciones ambientales y de movimiento, demandas excesivas de esfuerzo, privación de agua y alimento, estímulos aversivos, administración de drogas, preparaciones crónicas, aislamiento, y otras más. (Polanco, Góngora, et al. 2012, pp8)

Por otra parte, se asume que el estado emocional de ansiedad en humanos es equivalente a la respuesta de miedo en animales, por lo cual, las investigaciones con modelos animales no

humanos permiten imitar los procesos psicológicos normales y anormales como síntomas o síndromes psicopatológicos humanos y tratamientos para estas enfermedades. La ansiedad ha sido estudiada extensamente en modelos animales y existen más de treinta utilizados. Algunos recurren a respuestas condicionadas y otros modelos utilizan respuestas más naturales de la especie o no condicionadas. (Polanco, Góngora, et al. 2012, pp8)

La siguiente tabla indica los tipos de pruebas más usados para evaluar la ansiedad.

Tabla 5-1 Pruebas de mayor uso para evaluar ansiedad.

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

Fuente:(Polanco, Góngora, et al. 2012, pp8)

1.3.9.1 *Modelo de respuesta Condicionado*

Se basan en la capacidad de responder ante un estímulo con la respuesta específica a otro estímulo. Generalmente se presenta un estímulo aversivo, comúnmente un choque eléctrico, aplicado al animal quien debe emitir una respuesta determinada. Estos modelos permiten un control bastante preciso de los niveles de conducta basal por parte del experimentador, pero casi

permanentemente requieren que los sujetos de experimentación sean entrenados y se incluyan en el diseño experimental varios grupos de sujetos control para descartar los efectos no específicos del tratamiento sobre aspectos como el aprendizaje, la memoria, apetito y las funciones motoras y perceptuales. Algunas limitaciones en cuanto a su uso se conocen de estos modelos. Al exponer los sujetos a estímulos no habituales, se debe hacer un entrenamiento previo, además muchas de las versiones del modelo de condicionamiento están condicionadas según el grupo que la usa, y en cada una de ellas hay modificaciones en los parámetros de la prueba. (Polanco, Góngora, et al. 2012a, pp8)

1.3.9.2 Modelo de respuesta no Condicionado

Buscan medir la respuesta conductual o fisiológica ante estímulos estresantes o nuevos. Algunos evalúan el miedo ante situaciones novedosas, en donde el sujeto es expuesto a un espacio abierto, alto o luces brillantes. En estos modelos se evita hacer privación de agua o comida, así como la administración de choques eléctricos y no se requiere de periodos largos de entrenamiento. Según Pellow, Chopin, File & Briley estos modelos poseen ciertas ventajas para su utilización: tiene cierta validez ecológica al ser una prueba rápida y sencilla, es económica al no implicar equipos costosos, tiene cierta sensibilidad bidireccional, en cuanto a las manipulaciones de ansiedad, no se requiere de largos procedimientos de formación que impliquen la privación de alimento y agua. (Polanco, Góngora, et al. 2012b, pp8)

1.3.10 *Mus musculus*

Los animales de laboratorio son modelos experimentales que poseen la cualidad es precisa para poder investigar las enfermedades que afectan al ser humano, las ratas y ratones están entre los que cumplen con esos requerimientos, son de fácil manejo y tienen las características apropiadas. (Gérez & Gullace. 2011a, pp 56)

El animal de laboratorio es un ser vivo y debe ser tratado como tal, sabiendo que tiene necesidades, siente dolor, es por esto que es compromiso del investigador, asegurar su bienestar y confort mientras este con vida. (Gérez & Gullace. 2011b, pp 56)



Gráfico 7-1 Ratón *Mus musculus*

Fuente: (Gérez & Gullace. 2011c, pp 56)

1.3.10.1 Clasificación Taxonómica

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

Tabla 6-1 Clasificación taxonómica del ratón (*Mus musculus*).

Clasificación Taxonómica

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

Fuente: (Gérez & Gullace. 2011, pp 56)

1.3.10.2 Características generales

El ratón es un animal mamífero de sangre caliente, presenta hábitos nocturnos y la naturaleza de su comportamiento está influenciada por feromonas. Por su diminuto tamaño esta especie es muy susceptible a cambios ambientales, debido a que una variación de la temperatura en el rango de 2 a 3°C, puede modificar su fisiología por cambios en la temperatura corporal. (Benavides & Guénet. 2003a, pp 312)

El tamaño del ratón en su etapa adulta oscila entre 12 a 15 cm desde la punta de la cola a la punta de la nariz; la longitud de la cola es igual a la longitud del cuerpo y con un peso aproximado de 30 gr. Después del parto las crías tienen un peso aproximado que oscila entre 1 a 2 g, con un aumento considerable de peso durante la lactancia. El ratón de laboratorio es una

especie de naturaleza cosmopolita, se adapta a una gran variedad de condiciones ambientales, desde zonas tropicales a regiones muy frías, con preferencia por las zonas secas. (Benavides & Guénet. 2003b, pp 312)

Dentro de sus características de los sentidos destaca un agudo sentido auditivo, así también su sentido del olfato está muy desarrollado, no sólo para identificar precozmente comida y depredadores, sino también para percibir el orden social de su ambiente. (Benavides & Guénet. 2003c, pp 312)

Su visión en cambio es muy pobre, no pudiendo percibir los colores. Alrededor de la órbita del ojo se encuentran unas glándulas con forma de herradura denominadas glándulas Harderianas, responsables de la excreción de porfirina (sustancia de color marrón), excretada ante situaciones de premura o estrés. (Benavides & Guénet. 2003d, pp 312)

El sistema social va a estar en dependencia de la densidad de poblacional, presentan un rango social bien desarrollado por lo que son aptos modelos para determinaciones in vivo para evaluaciones de trastornos sociales y cognitivos. Comúnmente son muy dóciles, con excepción de algunas cepas sobre las cuales no se tenga estricto control en su cría, a las cuales se les denomina exocriadas y se caracterizan por mantener su agresividad, al igual que sus antecesores salvajes. (Benavides & Guénet. 2003e, pp 312)

1.3.10.3 Comportamiento

El ratón es un animal naturalmente sociable, que se mantiene en grupos sin ningún problema. Algunas cepas de machos comienzan a mostrar su agresividad entre la séptima y décima semana de edad, a pesar de que los grupos se hayan establecido justo después del destete. En el grupo de machos existe uno dominante que puede ser muy agresivo. Incidentes de peleas no se registran con frecuencia en hembras, inclusive cuando se hayan agrupado en una misma jaula en la edad adulta. (Benavides & Guénet. 2003f, pp 313)

El acto de alimentación es cíclico y presenta un pico máximo durante el periodo de oscuridad, así también el mayor consumo de agua se registra en la oscuridad. El ratón comúnmente divide su caja en áreas específicas para comer, dormir, orinar y defecar. Las hembras previo al parto construyen un nido en el cual permanecen mucho tiempo para el cuidado de sus crías. (Benavides & Guénet. 2003g, pp 313)

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de investigación

El trabajo de investigación que se realizó es de tipo experimental y se llevó a cabo en el Bioterio y el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

2.2 Recolección del Material vegetal

Para la obtención de extractos fue necesario materia vegetal de las plantas coruba de monte (*Passiflora mixta*) y granadilla (*Passiflora ligularis*), la primera recolectada en la parroquia la Candelaria del cantón Penipe de la provincia de Chimborazo, cuyas coordenadas GPS son: -1.53403, -78.51056, mientras que la segunda se consiguió en el sector el Guso del cantón Penipe de la provincia de Chimborazo cuyas coordenadas son: latitud: -1.6045601689869464, longitud: -78.62596392631531, altitud: 2670.

2.3 Identificación botánica

Se tomaron muestras del material vegetal, una de *Passiflora ligularis* y otra de *Passiflora mixta* las cuales fueron prensadas y entregadas en el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo a cargo del Ing. Jorge Caranqui.

2.4 Secado y molienda

Para realizar el secado y molienda de las plantas se necesitó de un lugar con ambiente oscuro y libre de humedad, el cual se realizó hasta conseguir valores de humedad dentro de los rangos

permitidos por la Farmacopea Española, los que permitieron realizar de forma adecuada la molienda, luego su posterior almacenaje en fundas ziploc para mantener la materia vegetal sellada de manera hermética.

2.5 Elaboración del extracto

Para elaborar los extractos, se realizaron ensayos preliminares que permitieron establecer la cantidad de planta seca y la cantidad de solvente a utilizar dando una relación de 1:5, por lo tanto se utilizó 10 g de planta seca y 50 mL de solvente mediante maceración por 24 horas, seguido de 1 hora de sonicación, para posteriormente filtrar y llevar el extracto obtenido a sequedad en el rotavapor a una temperatura no mayor a 60°C. Finalmente el extracto concentrado se etiquetó y selló, para así almacenarlo en refrigeración (0-8°C) para su aplicación en el ensayo. Para la obtención de los extractos se utilizó tres tipos de solventes: acetato de etilo, metanol y agua. El proceso de elaboración de cada uno de los extractos se detalla en los siguientes esquemas:

Extracto de Acetato de Etilo

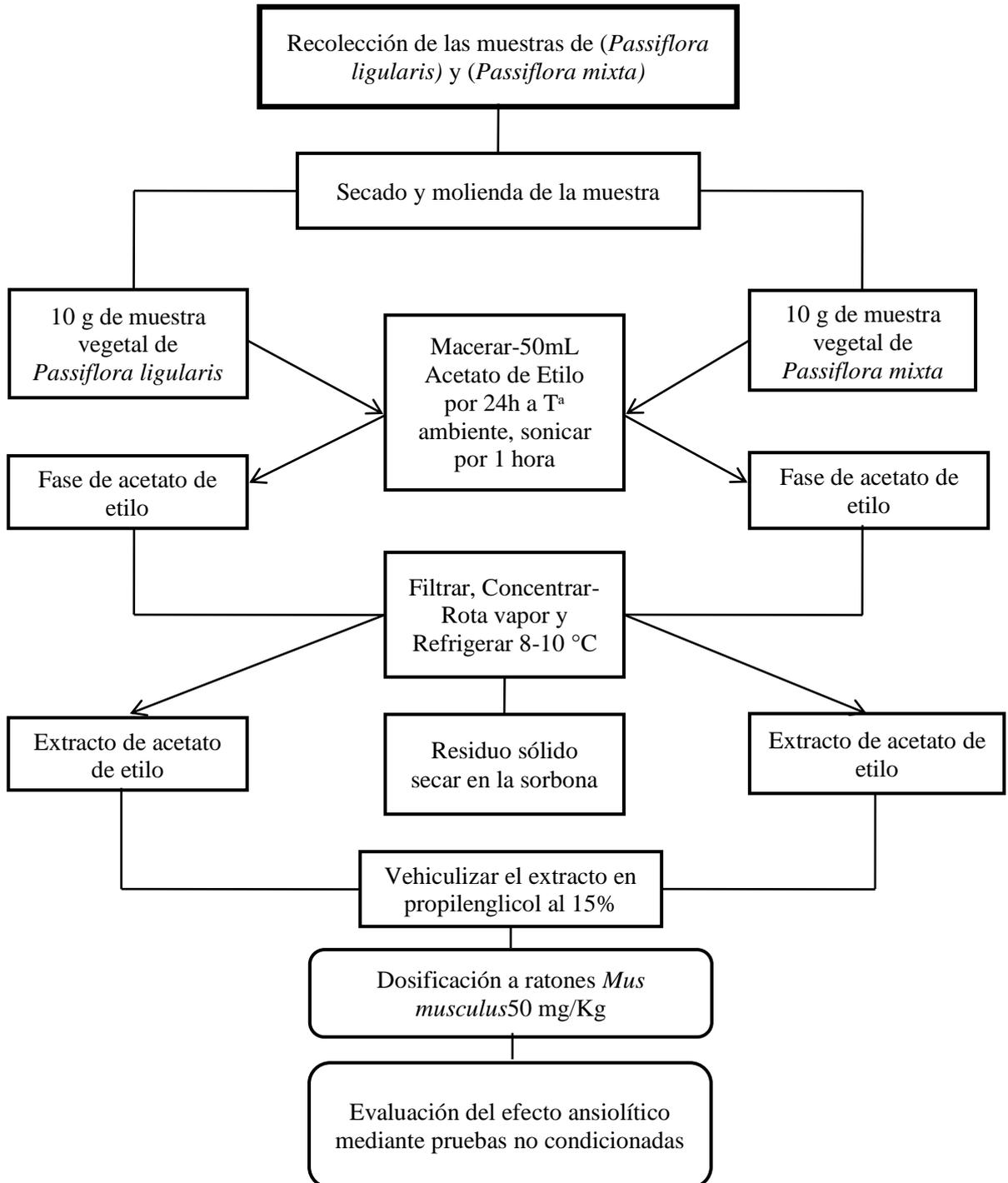


Figura 1-2 Esquema de elaboración del extracto de acetato de etilo.
Realizado por: Gisella Balseca, 2016

Extracto Metanólico

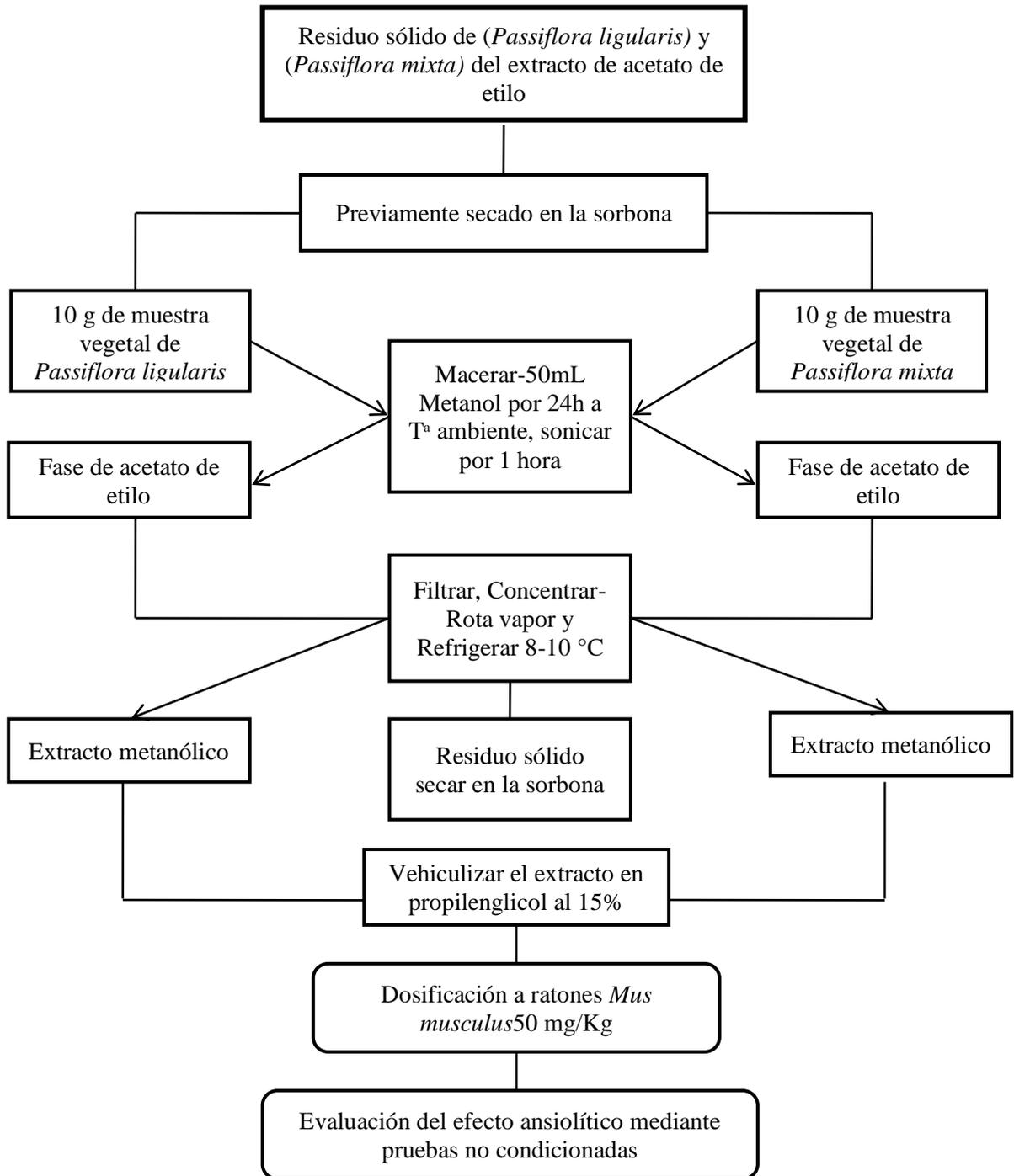


Figura 2-2 Esquema de elaboración del extracto metanólico.

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

Extracto Acuoso

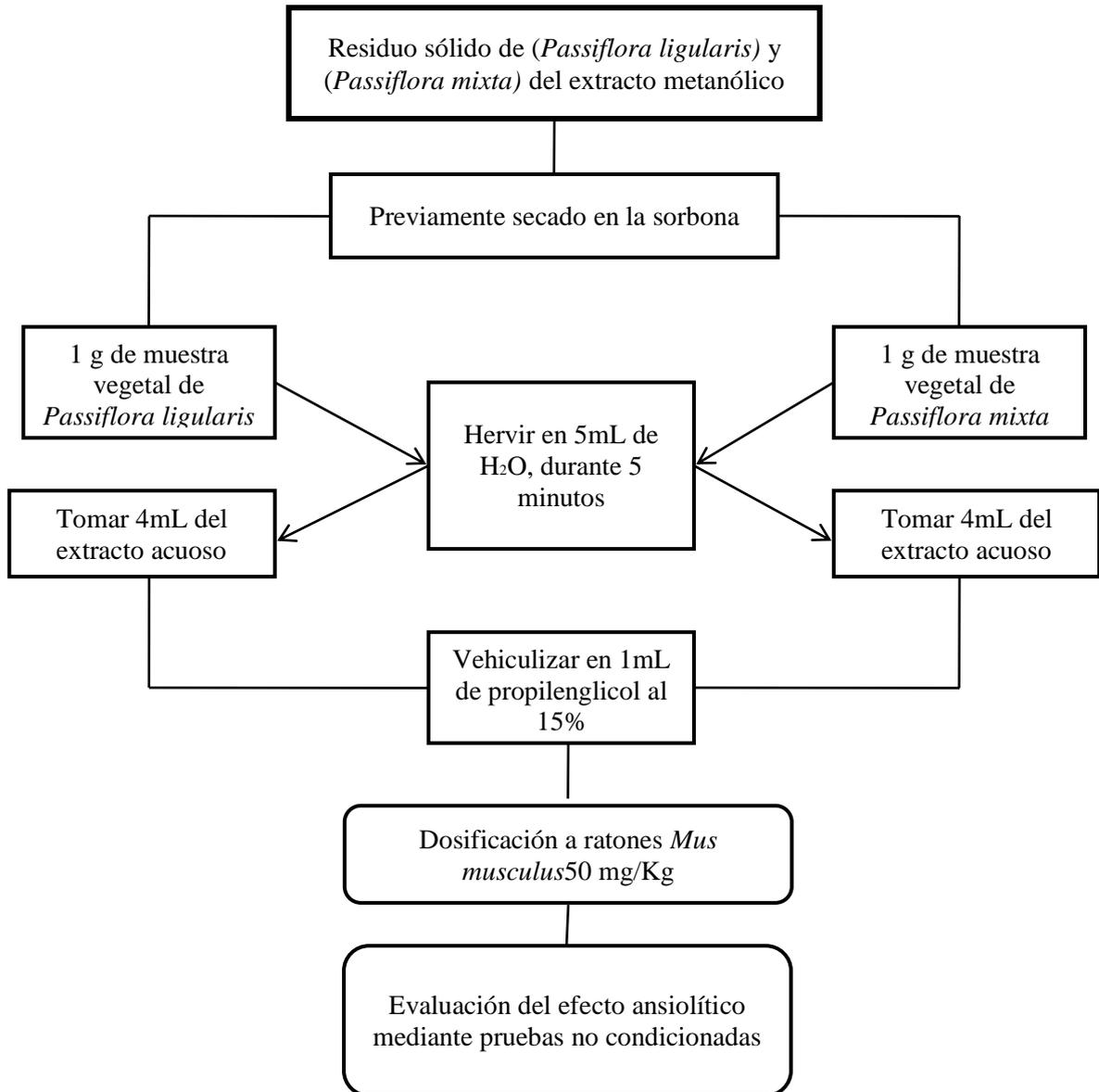


Figura 3-2 Esquema de elaboración del extracto acuoso.

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

2.6 Cálculos de la dosis a administrar

Para la determinación de la concentración que se debe pesar para disolver en el volumen a administrar se realizaron cálculos en base al peso del ratón *Mus musculus* y a la dosis ya establecida en este caso para el control (Clonazepam) 0,5 mg y para los diferentes extractos 50 mg.

2.6.1 Control

$$32.82g \times \frac{1kg}{1000g} \times \frac{0.5mg}{1kg} = 0.016mg/0.5mL$$

$$4mL \times \frac{0.016 mg}{0.5 mL} = 0.128mg/4mL$$

32,82 g = peso del ratón

0,5 mL = volumen máximo de administración al ratón

0,5 mg = dosis de Clonazepam a administrar

4 mL = volumen usado para administrar a 5 ratones

2.6.2 Extractos

$$31.62g \times \frac{1kg}{1000g} \times \frac{50mg}{1kg} = 1.58mg/0.5mL$$

$$4mL \times \frac{1.58 mg}{0.5 mL} = 12.64mg/4mL$$

31,62 g = peso del ratón

0,5 mL = volumen máximo de administración al ratón

50 mg = dosis de extracto a administrar

4 mL = volumen usado para administrar a 5 ratones

2.7 Evaluación de la actividad ansiolítica

Los animales de experimentación empleados en este estudio fueron ratones *Mus musculus* hembras obtenidos del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación (INSPI), con una edad promedio de 21 días y un peso de 25 – 30 gramos, los cuales recibieron un proceso de adaptación previa a la dosificación, que consiste en la alimentación y condiciones ambientales que fueron establecidas según el protocolo de investigación del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia, para la determinación de la actividad ansiolítica se realizó pruebas neurológicas no condicionadas en ratones (*Mus musculus*),

Para el estudio se dividió a la población de ratones, en 4 grupos, que se identificaban según la sustancia a administrar, a saber la especie de *Passiflora*, Clonazepam (Grupo control) y blanco. Dentro de estos grupos se formaron subgrupos representados por el extracto correspondiente a

la parte de la planta empleada, y éstos a su vez compuestos por 5 ratones tal como se detalla en la siguiente tabla

Tabla 1-2 Descripción de los grupos formados para la administración de extractos.

Designación del Grupo	Sustancia a Administrar	Parte de la planta	Extracto	Nº Ratones
G1	Blanco			5
G2	Clonazepam			5
G3	<i>Passiflora ligularis</i>	Hojas	Acetato de Etilo	5
		Flores		5
		Hojas	Metanol	5
		Flores		5
		Hojas	Agua	5
		Flores		5
G4	<i>Passiflora mixta</i>	Hojas	Acetato de Etilo	5
		Flores		5
		Hojas	Metanol	5
		Flores		5
		Hojas	Agua	5
		Flores		5

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

Los extractos se administraron en dosis STAT al 100% por vía oral, siendo la duración del tratamiento de 1 semana. A cada grupo de ratones se efectuó pruebas neurológicas (laberinto elevado, cuarto claro y oscuro, campo abierto y miorelajante) a las 30 min posteriores a la administración de la dosis. Las pruebas farmacológicas efectuadas se detallan a continuación:

2.7.1 Ensayo de Campo Abierto (OFT)

Fue descrita por Hall en 1934, valoraba el grado de “emocionalidad” (ansiedad). Consiste en colocar al roedor en un medio ambiente desconocido. De acuerdo con sus observaciones, Hall consideraba que esta respuesta estaba regulada por medio de la actividad del sistema nervioso autónomo (simpático) y tomó como primeras medidas sugerentes de ansiedad a la defecación y la micción.

La prueba se hace en una caja de vidrio (con paredes y piso transparente de 48x48x 30 cm), cuyo piso se divide con líneas pintadas de color negro formando cuadros de 12 x 12 cm. La prueba se registra durante cinco minutos y, generalmente, se toman dos medidas: el total de la distancia recorrida, número de líneas cruzadas marcadas en el piso, considerada como la

actividad locomotriz, y el tiempo de permanencia en el área central de la caja, en consideración de que el área central de la caja es más amenazante que la periferia, basado en que la permanencia del roedor en el área central es incrementada con fármacos ansiolíticos. (Rejón & Perdomo. 2010a, pp5)

2.7.2 Laberinto en Cruz Elevado (EMP)

El laberinto elevado es un modelo válido para evaluar la ansiedad, porque utiliza estímulos naturales, miedo a los espacios abiertos y miedo caminar sobre una plataforma elevada y relativamente estrecha, que inducen ansiedad en los humanos, también se considera que el miedo que genera en los roedores se debe a la falta de estímulos tigmotácticos. Originalmente desarrollada con ratas, en la actualidad se ha valido su uso con ratones. En este método se utiliza un laberinto en forma de cruz de 30 cm de longitud, con dos extremos cerrados y dos abiertos (15 cm cada extremo), colocado con una elevación del piso de 38,5 cm. La prueba dura cinco minutos; se coloca al ratón en el centro del laberinto con dirección hacia un espacio abierto y se cuantifica el tiempo que permanece en los espacios, así como el número de entradas a cada espacio. (Nin, Dalprá, et al. 2012, pp 95)

2.7.3 Cuarto Claro y Oscuro

En este método se usa una cámara de prueba de propileno de 44 x 21 x 21 cm, oscurecida con pintura negra sobre un tercio de su superficie; tiene una abertura de 13 x 5 cm que separa la zona sombreada de la zona sin pintar, El principal factor ansiogénico se fundamenta en el conflicto entre el comportamiento exploratorio del ratón y la aversión natural hacia el área abierta e iluminada (brillante) de esta prueba. Al comienzo de la prueba, el animal se coloca en el lado brillante de la caja y se observa su conducta, registrándola en un periodo de 10 minutos; un incremento entre el número de transiciones entre el lado oscuro y brillante, o un aumento en el tiempo de permanencia en el lado iluminado, se considera como un indicativo de la reducción en la ansiedad. Aunque los roedores pueden explorar con libertad ambos compartimientos, muestran una clara preferencia a permanecer en el lado oscuro.

(Rejón & Perdomo. 2010b, pp5)

2.7.4 Prueba de la Chimenea

Esta prueba evalúa la capacidad de un ratón de subir marcha atrás por un tubo de vidrio, el cual tiene una marca a 20 cm. de uno de los extremos y cuyo diámetro varía según el peso del ratón (22 mm para un ratón de 15 a 18 g, y 28 mm para un ratón de peso comprendido entre 20 y 30

g). Se introdujo al ratón por el extremo del tubo más próximo a la marca y cuando el ratón alcanzó el otro extremo, el tubo se puso en posición vertical. Inmediatamente, el animal trató de subir a reculones por el tubo, llegando en condiciones normales a la marca en menos de 30 segundos. Si presenta incoordinación motriz o no consigue hacerlo, por esta razón es necesario establecer condiciones iniciales antes de administrar el principio activo a ensayar, lo que nos servirá para descartar a individuos que no superan dicha prueba.

Se usaron grupos de cinco ratones hembras a los que se les administra por vía oral, productos patrones. A los 10 minutos después de la administración, se utiliza la prueba, anotándose el tiempo que tardan en subir marcha atrás por el tubo. Se considera como fracaso cuando el animal no supera la marca antes de los 30 segundos. (Cardoso, Paiva, et al. 2009, pp 7-325)

2.8 Evaluación de la toxicidad en *Artemia salina*

Para realizar la toxicidad por *Artemia salina* primero se activan los huevecillos en sal marina nutritiva a una temperatura de 25-30 °C aproximadamente, la composición de la sal marina es la siguiente: 23g de NaCl, 11g de MgCl₂, 4g Na₂SO₄, 1.3g de CaCl₂, 0.7g de KCl y 300g de *Artemia salina*, todo esto disuelto en 1L de agua destilada. Una vez que la solución está lista se las dejó por 24 horas en las condiciones adecuadas de calor, luz y oxigenación.

Pasada las 24 horas luego de la eclosión con ayuda de una pipeta automática se contaron 10 nauplios de *Artemia salina* y se las colocó en los tubos con los extractos a diferentes concentraciones (10ppm, 100ppm, 500ppm y 1000ppm), posteriormente se las dejó en las condiciones antes mencionadas y a las siguientes 24 horas se realizó el conteo de nauplios de *Artemia* viva y así obtuvimos la toxicidad de los extractos, guiándonos en el número de *Artemia* que sobrevivieron después de 24 horas de exposición al extracto.

2.9 Materiales y Equipos

Para la realización de la parte práctica, obtención de extractos se utilizaron los siguientes equipos y materiales:

Tabla 2-2 Equipos y materiales usados para la parte práctica

EQUIPOS	
Molino	De cuchillas marca Arthur H, Tomas. C.O. Phila. PA. USA
Sonicador	Marca Branson 2510
Estufa	Marca Mermmet
Rotavapor	BUCHIRotavapor R110 & B-465 Water Bath
Balanza analítica	Balanza electrónica marca RADWAG, de 220 g de capacidad x 0,1 mg de lectura mínima.
MATERIALES	
Erlenmeyer 50 mL	Balones esmerilados 50 mL
Vasos de precipitación 50 mL	Tubos de ensayo
Pipetas volumétricas de 1 y 5 mL	Embudo
Trípode	Gradilla
Reverbero	Probeta 50 mL
Espátula	Pesa muestra

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

CAPÍTULO III

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

3.1 Evaluación de la Actividad Ansiolítica

Los modelos que se emplearon para la evaluación de la actividad ansiolítica en animales fueron: laberinto en cruz elevado (EPM), el ensayo de campo abierto (OFT), cuarto claro/oscuero y prueba de la chimenea, los parámetros evaluados fueron:

- Tiempo de permanencia en brazos abiertos.-Un mayor tiempo de permanencia en los brazos abiertos refleja menor ansiedad, ante un entorno inmediato nuevo y novedoso que, además genera vértigo.
- Tiempo de permanencia en brazos cerrados.-Un mayor tiempo de permanencia en los brazos cerrados refleja mayor miedo y ansiedad ante el entorno nuevo.
- Tiempo de permanencia en el centro del dispositivo.-Un mayor tiempo de permanencia en el centro del modelo OFT refleja menor ansiedad ante un entorno que sugiere miedo y estrés al animal.
- Tiempo de permanencia en la periferia.-Un mayor tiempo de permanencia en la periferia refleja mayor ansiedad, identificada por un reflejo de ubicarse hacia las esquinas, evitando la amenaza que supone el centro del modelo.
- Tiempo de permanencia cuarto claro.-Un mayor tiempo de permanencia en el cuarto claro refleja menor ansiedad ya que por la naturaleza del animal este prefiere la oscuridad para pasar desapercibido en situaciones de miedo o peligro al ser un lugar extraño.
- Tiempo de escape.-Un mayor tiempo en salir del tubo de aproximadamente 20cm de longitud refleja una mayor actividad miorelajante, debido a que el ratón al encontrarse calmado y relajado no hace mayor esfuerzo para salir del lugar en donde se encuentra atrapado.

3.1.1 Ensayo de Laberinto Elevado en Cruz (EPM)

3.1.1.1 Análisis del promedio y desviación estándar en relación al tiempo de permanencia en los brazos abiertos del dispositivo (laberinto elevado en cruz).

Tabla 1-3 Laberinto elevado (EPM), *P. ligularis*

<i>P. ligularis</i>		tiempo de permanencia en los brazos abiertos en segundos					
Blanco	Control	Hojas AcOEt	Hojas MeOH	Hojas H ₂ O	Flores AcOEt	Flores MeOH	Flores H ₂ O
79,6±37,5	175,8±51,7	85,6±44,9	82,2±69,8	37,6±27	39,6±20,4	116,2±35,8	45,8±10,2

Valores promedio ± SD, n=5, p>0,05

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

AcOEt: Acetato de etilo

MeOH: Metanol

H₂O: Agua

SD: Desviación estándar

Tabla 2-3 Laberinto elevado (EPM), *P. mixta*

<i>P. mixta</i>		tiempo de permanencia en los brazos abiertos					
Blanco	Control	Hojas AcOEt	Hojas MeOH	Hojas H ₂ O	Flores AcOEt	Flores MeOH	Flores H ₂ O
79,6±37,5	175,8±51,7	54,6±21,8	60,2±21	59±28	59±24,1	116,2±61,2	58,2±26,2

Valores promedio ± SD, n=5, p>0,05

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

AcOEt: Acetato de etilo

MeOH: Metanol

H₂O: Agua

SD: Desviación estándar

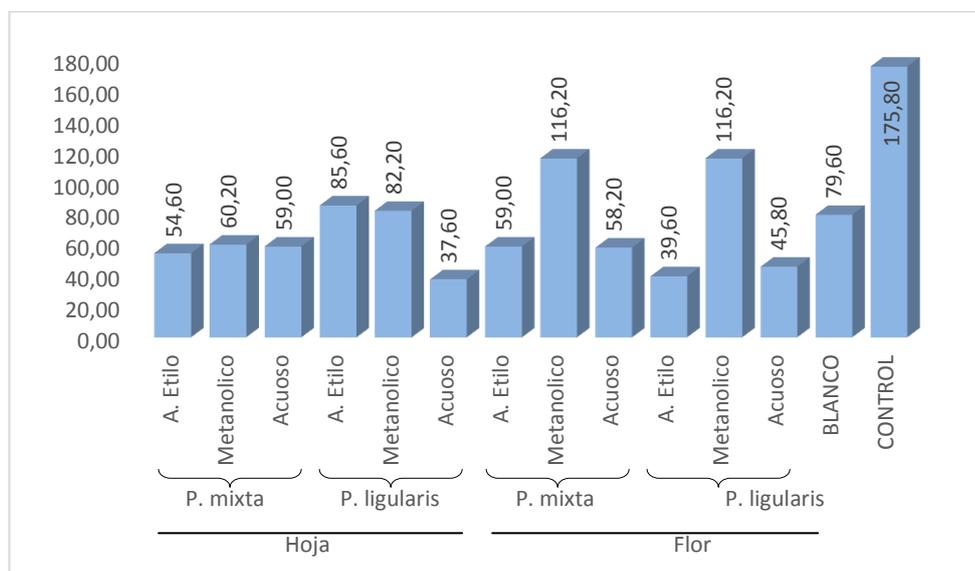


Figura 1-3 Efecto de los diferentes extractos reconstituidos en propilenglicol de *Passiflora ligularis* y *Passiflora mixta*, evaluado en el modelo EPM.

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

3.1.1.2 *Discusión de resultados*

El Laberinto elevado en cruz es el modelo animal que ayuda a determinar la ansiedad mediante la evaluación de varios parámetros como son el número de entradas en los brazos cerrados, a mayor número de entradas a los brazos cerrados indica que el individuo se encuentra ansioso. También es un determinante de ansiedad el menor tiempo de permanencia en los brazos abiertos, de manera que existe mayor ansiedad cuando hay menor exploración en aquellos, debido al conflicto de permanecer en estos brazos. (Polanco, Góngora, et al. 2012, pp8).

El parámetro más relevante utilizado para determinar la ansiedad en esta prueba fue el tiempo de permanencia en los brazos abiertos, como se puede observar en la tabla 10-3 y 11-3 en donde se detallan el promedio y la desviación estándar de la respuesta para cada grupo evaluado, queda evidenciado que no existe diferencia entre los resultados obtenidos por los extractos metanólicos correspondientes a flores de *P. mixta* y flores de *P. ligularis* así como el extracto de acetato de etilo de hojas de *P. ligularis* con respecto al resultado del control (clonazepam, 0,5 mg/kg), por lo tanto estos extractos fueron los que presentaron una actividad ansiolítica representativa, resultados que pueden ser comparados con los datos obtenidos en el trabajo de Carretero (2015., pp 2), ya que fueron realizados en *Passiflora edulis*, indicando que los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de flores tienen efectos ansiolíticos de mayor intensidad. No se pudieron comparar los resultados obtenidos con plantas de la misma especie, ya que no se encontraron estudios para esta actividad.

3.1.2 *Ensayo de Campo Abierto (OFT)*

3.1.2.1 *Análisis del promedio y desviación estándar al tiempo de permanencia en el centro del modelo del dispositivo (campo abierto)*

Tabla 3-3 Campo abierto (OFT), *P. ligularis*

<i>P. ligularis</i>		tiempo de permanencia en el centro de modelo en segundos					
Blanco	Control	Hojas AcOEt	Hojas MeOH	Hojas H ₂ O	Flores AcOEt	Flores MeOH	Flores H ₂ O
15,6±9,3	240,8±33,4	10,4±5	12,8±5,9	6±3,2	6,2±2,9	10,4±4,1	13±5,2

Valores promedio ± SD, n=5, p>0,05

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

AcOEt: Acetato de etilo

MeOH: Metanol

H₂O: Agua

SD: Desviación estándar

Tabla 4-3 Campo abierto (OFT), *P. mixta*

<i>P. mixta</i> tiempo de permanencia en el centro de modelo en segundos							
Blanco	Control	Hojas AcOEt	Hojas MeOH	Hojas H ₂ O	Flores AcOEt	Flores MeOH	Flores H ₂ O
15,6±9,3	240,8±33,4	15,6±11,2	6,4±5	8,8±3,6	12,6±7,2	6,8±3,9	7,4±5,1

Valores promedio ± SD, n=5, p>0,05

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

AcOEt: Acetato de etilo

MeOH: Metanol

H₂O: Agua

SD: Desviación estándar

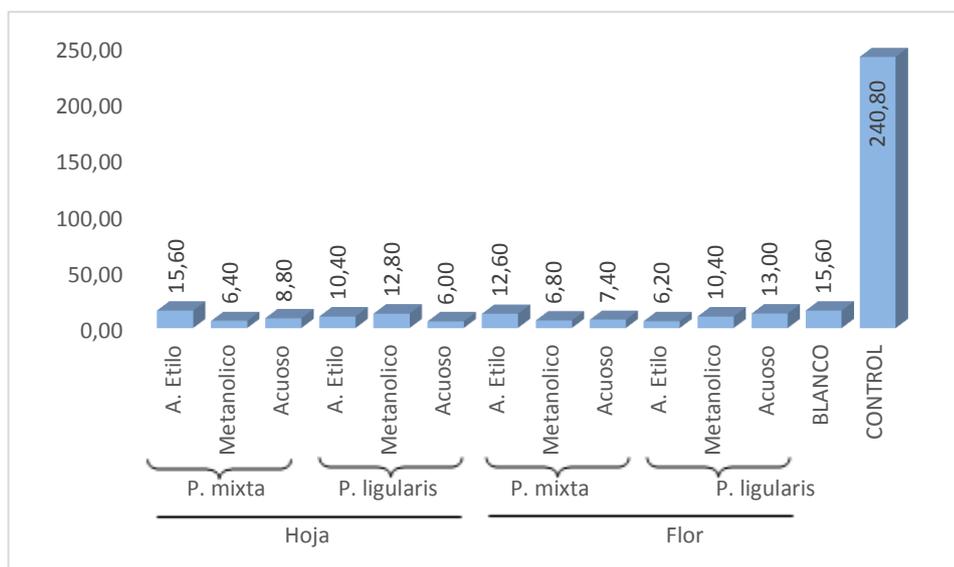


Figura 2-3 Efecto de los diferentes extractos reconstituidos en propilenglicol de *Passiflora ligularis* y *Passiflora mixta*, evaluado en el modelo campo abierto (OFT).

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

3.1.2.2 Discusión de resultados

El ensayo de campo abierto es una de las pruebas más antiguas, simples y ampliamente utilizadas en psicofarmacología, dónde se evalúa la actividad locomotriz, y el tiempo de permanencia en el área central de la caja, en consideración de que el área central de la caja es más amenazante que la periferia. La permanencia del roedor en el área central es incrementada con fármacos ansiolíticos. (J. Cárdenas y J.F. Navarro, 2002a, pp 9)

En los resultados analizados de éste ensayo se considera como parámetro más relevante el tiempo de permanencia del ratón en el centro del modelo, pudiendo distinguir que existe diferencia entre los resultados obtenidos por los extractos y el del control (clonazepam, 0,5 mg/kg), mientras que al comparar los resultados del blanco con los obtenidos por los extractos, no son diferentes, por lo tanto se puede decir que en esta prueba los extractos no tienen

actividad ansiolítica.

3.1.3 Prueba cuarto claro/oscuro

3.1.3.1 Análisis del promedio y desviación estándar en relación al tiempo de permanencia en el cuarto claro del dispositivo (prueba cuarto claro/oscuro)

Tabla 5-3 Cuarto claro, *P. ligularis*

<i>P. ligularis</i>							
tiempo de permanencia en el cuarto claro en segundos							
Blanco	Control	Hojas AcOEt	Hojas MeOH	Hojas H ₂ O	Flores AcOEt	Flores MeOH	Flores H ₂ O
34±16	271,6±22,2	110±18,5	150,2±72,2	67,8±25,4	54,8±38,9	106,4±62,2	138±24,3

Valores promedio ± SD, n=5, p>0,05

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

AcOEt: Acetato de etilo

MeOH: Metanol

H₂O: Agua

SD: Desviación estándar

Tabla 6-3 Cuarto claro, *P. mixta*

<i>P. mixta</i>							
tiempo de permanencia en el cuarto claro en segundos							
Blanco	Control	Hojas AcOEt	Hojas MeOH	Hojas H ₂ O	Flores AcOEt	Flores MeOH	Flores H ₂ O
34±16	271,6±22,2	44±21,3	120±31,1	113±15,3	120±31,1	103,6±36,7	136,8±48,2

Valores promedio ± SD, n=5, p>0,05

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

AcOEt: Acetato de etilo

MeOH: Metanol

H₂O: Agua

SD: Desviación estándar

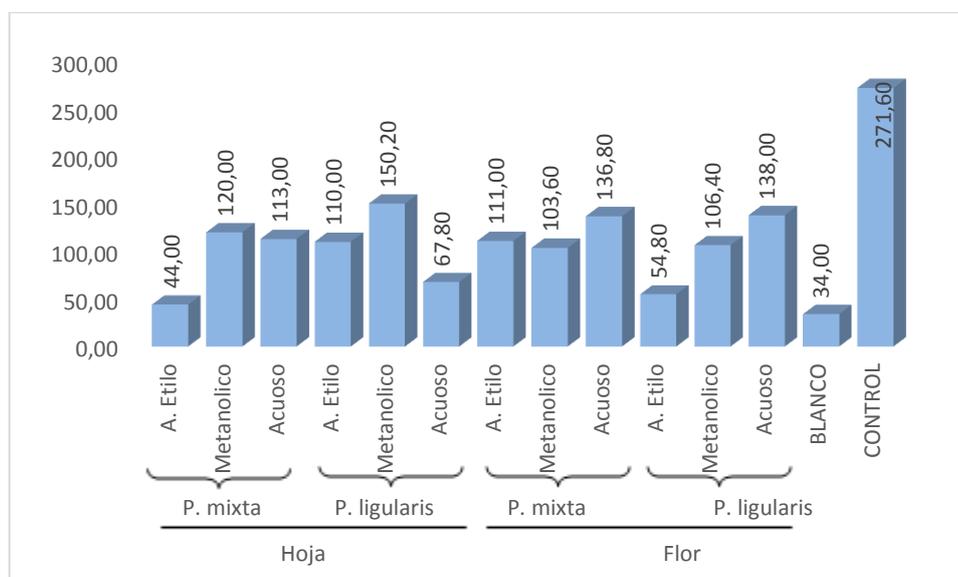


Figura 3-3 Efecto de los diferentes extractos reconstituidos en propilenglicol de *Passiflora ligularis* y *Passiflora mixta*, evaluado en el cuarto claro.

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

3.1.3.2 *Discusión de resultados*

El principio etológico en el que se basa esta prueba es que los roedores, por ser animales nocturnos, presentan una aversión natural a la luz, con lo que normalmente pasarán más tiempo en el compartimiento oscuro que en el iluminado. Por otra parte, su motivación exploratoria los lleva a intentar conocer el medio no familiar al que son expuestos, lo cual hace que el animal transite de un compartimiento a otro. (J. Cárdenas y J.F. Navarro, 2002b, pp 9)

Al analizar los parámetros considerados para el ensayo del cuarto claro/oscurο siendo el más importante el tiempo de permanencia en el cuarto claro se puede observar en la tabla 14-3 el valor de la media y desviación estándar de cada grupo evaluado, donde se evidencia la diferencia entre los resultados obtenidos por los extractos y el resultado del control (clonazepam, 0,5 mg/kg), como es el caso del extracto metanólico de hojas de *P. ligularis*, que es el que presenta una mejor actividad ansiolítica, resultados que pueden ser comparados con los datos obtenidos en el trabajo de Cerna J (2016., pp 12), que fueron realizados en *Passiflora edulis*, indicando que los extractos hidroalcohólicos de flores tienen efectos ansiolíticos de mayor intensidad. No se pudieron comparar los resultados obtenidos con plantas de la misma especie, ya que no se encontraron estudios para esta actividad.

3.1.4 *Prueba de la Chimenea*

3.1.4.1 *Análisis de promedio y desviación estándar del tiempo que tarda en salir el ratón de retro de un tubo de 20 cm de longitud*

Tabla 7-3 Prueba de la Chimenea, *P. ligularis*

<i>P. ligularis</i>		tiempo que tarda en salir el ratón de retro					
Blanco	Control	Hojas AcOEt	Hojas MeOH	Hojas H ₂ O	Flores AcOEt	Flores MeOH	Flores H ₂ O
19,8±17,7	60±0	1,6±3,7	4,9±4,7	15,5±4,3	0±0	14,±6,7	23,2±17,7

Los valores son promedio ± SD

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

AcOEt: Acetato de etilo

MeOH: Metanol

H₂O: Agua

SD: Desviación estándar

Tabla 8-3 Prueba de la Chimenea, *P. mixta*

<i>P. mixta</i>		tiempo que tarda en salir el ratón de retro					
Blanco	Control	Hojas AcOEt	Hojas MeOH	Hojas H ₂ O	Flores AcOEt	Flores MeOH	Flores H ₂ O
19,8±17,7	60±0	0±0	1,36±3,05	8,72±6,07	1,71±3,81	1,06±2,37	21,43±9,85

Los valores son promedio ± SD

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

AcOEt: Acetato de etilo

MeOH: Metanol

H₂O: Agua

SD: Desviación estándar

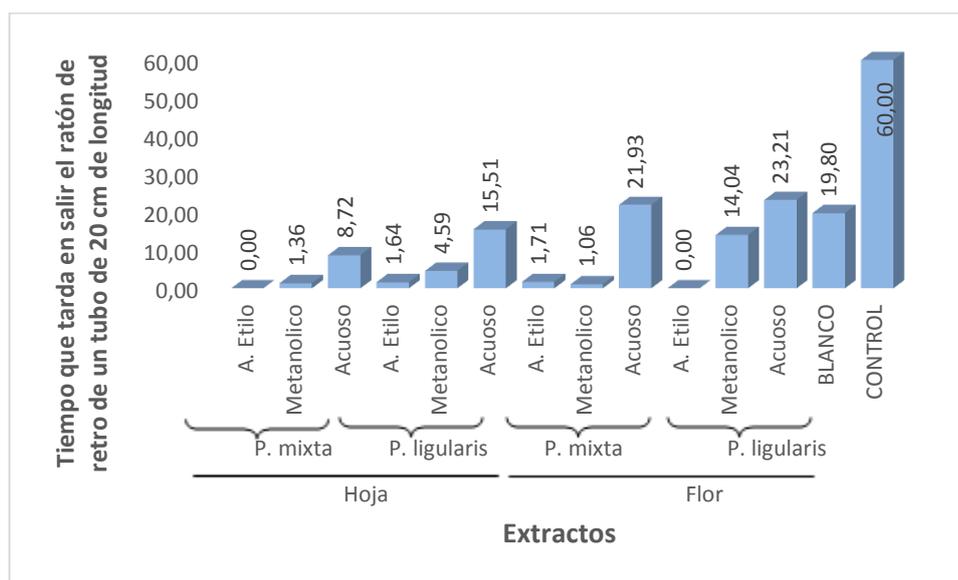


Figura 4-3 Efecto de los diferentes extractos reconstituidos en propilenglicol de *Passiflora ligularis* y *Passiflora mixta*, evaluado mediante la prueba de Chimenea. Realizado por: Gisella Balseca, 2016

3.1.4.2 Discusión de resultados

Un mayor tiempo en salir del tubo de aproximadamente 20 cm de longitud refleja una mayor actividad miorelajante, debido a que el ratón al encontrarse calmado y relajado no hace mayor esfuerzo para salir del lugar en donde se encuentra atrapado.

Los resultados del análisis de la prueba de la chimenea indica que existe diferencia entre los resultados obtenidos por los extractos y el resultado del control (clonazepam, 0,5 mg/kg), como es el caso del extractoacuoso de flores de *P. ligularis*, ya que es el valor que más se acerca al valor del control, es decir presenta mejor actividad miorelajante, en la tabla 7-3 se puede observar la media y la desviación estándar de cada grupo evaluado. No se pudieron comparar los resultados obtenidos con plantas de la misma especie, ya que no se encontraron estudios para esta actividad.

3.2 Toxicidad en *Artemia salina*

3.2.1 Determinación de la toxicidad mediante *Artemia salina*.

Tabla 9-3 Cantidad de *Artemia salina* que viven después de 24 horas de exposición al extracto

<i>Artemia salina</i>	
Variables	LC ₅₀
H <i>P.mixta</i> AcOEt	157 ppm
F <i>P.mixta</i> AcOEt	510 ppm
H <i>P.ligularis</i> AcOEt	240 ppm
F <i>P.ligularis</i> AcOEt	797 ppm
H <i>P.mixta</i> MeOH	7 ppm
F <i>P.mixta</i> MeOH	< a 10 ppm
F <i>P.ligularis</i> MeOH	73 ppm
H <i>P.ligularis</i> MeOH	644 ppm
H <i>P.mixta</i> H ₂ O	257 ppm
F <i>P.mixta</i> H ₂ O	235 ppm
H <i>P.ligularis</i> H ₂ O	277 ppm
F <i>P.ligularis</i> H ₂ O	426 ppm

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

H: Hoja F: Flor AcOEt: Acetato de etilo MeOH: Metanol H₂O: Agua

3.2.2 Discusión de resultados

Para establecer la toxicidad en *Artemia salina* se determina la concentración letal media, la misma que indica la cantidad requerida de extracto para causar la muerte del 50% de *Artemia salina* después de 24 horas de exposición a los extractos.

Una vez calculada la dosis letal media se pudo determinar que el extracto que presenta mayor toxicidad fue el extracto metanólico de flores de *P.mixta* ya que su concentración letal media es menor a los 10 ppm, mientras que el extracto que presenta mayor seguridad es el extracto de acetato de etilo de flores de *P. ligularis* ya que presentó una concentración letal media de 797.00 ppm, que es la mayor.

CONCLUSIONES

- En el análisis *in vivo* de la actividad ansiolítica en el modelo de Laberinto elevado en cruz se determinó que los extractos que presenta una mejor actividad ansiolítica son los extractos metanólicos correspondientes a flores de *P. mixta* y a flores y hojas de *P. ligularis* ya que en los resultados presentan un mayor tiempo de permanencia en los brazos abiertos en comparación con el resultado de los demás extractos.
- En el modelo Campo Abierto se evidencia que los extractos no presentan actividad ansiolítica debido a que el valor de los resultados de ningún extracto tiene un tiempo de permanencia en el centro del modelo cercano al valor del resultado del grupo control, en este caso existen grupos que presentan valores menores que el valor del blanco.
- En el modelo Cuarto claro/oscurο se demuestra que el extracto que presenta mejor actividad ansiolítica es el extracto metanólico de hojas de *P. ligularis* ya que tiene un mayor tiempo de permanencia en el cuarto claro en relación a los demás grupos, permaneciendo 150,20 segundos en el cuarto claro.
- En la evaluación de la actividad miorelajante se evidencia que el extracto que mejor actividad posee es el extracto acuoso de flores de *P. ligularis* debido a que el ratón demora más tiempo en salir de retro por un tubo de 20 cm de longitud con un tiempo de 23,21 segundos.
- Se determinó la toxicidad de los diferentes extractos en *Artemia salina* demostrando que el extracto que presenta mayor toxicidad fue el extracto metanólico de flores de *P. mixta* debido a que su concentración letal media fue menor a 10 ppm, y el extracto más seguro fue el de acetato de etilo de flores de *P. ligularis* ya que presentó una concentración letal media de 797,00 ppm.
- De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que los extractos que presentan mejor actividad ansiolítica son los metanólicos de flores de *P. ligularis* y *P. mixta* ya que son los que sobresalen en las pruebas de laberinto en cruz elevada y cuarto claro/oscurο, sin embargo el extracto metanólico de flores de *P. ligularis* es el más seguro de acuerdo a la evaluación de toxicidad en *Artemia salina*.

RECOMENDACIONES

- Para la determinación de la actividad ansiolítica se recomienda a las autoridades responsables del Bioterio realizar la adquisición de equipos apropiados que consten de cámaras y sensores de movimientos que proporcionen resultados más certeros de cada una de las pruebas.
- Para la determinación de toxicidad se recomienda buscar un modelo óptimo que proporcione resultados más confiables, en cuanto al daño que causan los extractos a los diferentes órganos del animal de experimentación, lo más recomendable es realizar perfiles hepáticos antes y después de la administración de la dosis.
- Una vez que se conoció el extracto, la parte y la planta que mejor resultado presentó, se debería hacer un estudio utilizando diferentes dosis para poder determinar la dosis que presenta una mejor actividad ansiolítica.

GLOSARIO

BZ Benzodicepínico

Cl Cloro

EPM Laberinto en cruz elevado (Elevated plus-maze)

EPOC Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FDA Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration)

GABA Ácido- γ -aminobutírico

g Gramos

LC₅₀ Concentración letal media

OFT Ensayo de campo abierto (Open Field Test)

OMS Organización Mundial de la Salud

P. ligularis *Passiflora ligularis*

P. mixta *Passiflora mixta*

SNC Sistema Nervioso Central

TA Trastorno de Ansiedad

TAG Trastorno de Ansiedad Generalizada

TCC Terapia Cognitivo Conductual

TEPT Trastorno del Estrés Postraumático

TOC Trastorno Obsesivo-Compulsivo

BIBLIOGRAFÍA

1. **ABU-YOUSIF AO, SMITH KA, GETSIOS S, GREEN KJ, VAN DROSS RT, PELLING JC.** *Enhancement of UVB-induced apoptosis by apigenin in human keratinocytes and organotypic keratinocyte cultures.* *Cancer Res* [En línea]. Vol 58, nº 8 (2008), pp: 65-3057. [Consulta: 14 junio 2016]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18413777>
2. **ASTURIZAGA AS, ØLLGAARD B, BALSLEV H.** *Frutos comestibles.* *Bot Econ los Andes Cent* [En línea]. (2006), pp: 329–46. [Consulta: 20 junio 2016]. Disponible en: [http://www.beisa.dk/Publications/BEISA Book pdfer/Capitulo 21.pdf](http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2021.pdf)
3. **BENAVIDES F, GUÉNET J.** *Sistemática de los roedores utilizados en el laboratorio.* *Man genética roedores Lab Principios básicos y Apl.* (2003), pp:312. [Consulta: 23 julio 2016]. Disponible en: <http://secal.es/wp-content/uploads/2014/10/03-GENETICA-Pba-2.pdf.pdf>
4. **BOBES J, SAIZ A, GONZALES P.** *Trastornos de Ansiedad.* *Mend2.Pdf* [En línea]. Vol 7 nº 106 (2010), pp: 38–48. [Consulta: 17 julio 2016]. Disponible en: [file:///D:/TESIS/ARTICULOS/Neurotransmisores de la Ansiedad.pdf](file:///D:/TESIS/ARTICULOS/Neurotransmisores%20de%20la%20Ansiedad.pdf)
5. **CARRETERO M.** *Plantas Medicinales para alteraciones del sueño, ansiedad y depresión: Pasiflora.* Pdf [En línea]. [Consulta: 29 octubre 2016]. Disponible en: <https://botplusweb.portalfarma.com/Documentos/2015/6/10/86274.pdf>.
6. **CARDOSO VILELA F, SONCINI R, GIUSTI-PAIVA A.** *Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice.* *J Ethnopharmacol* [En línea]. Vol 2 nº 124 (2009), pp: 325–7. [Consulta: 14 junio 2016]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874109002591>
7. **CHAN M.** La atención primaria de salud, más necesaria que nunca. *Revista Cuba Salud Publica.* [en línea] Vol. 35 nº 4 (2009), pp 29–30. [Consulta:19 mayo 2016]. Disponible en: http://www.who.int/whr/2008/08_report_es.pdf
8. **DHAWAN K, DHAWAN S, SHARMA A.** *Passiflora: A review update.* *J Ethnopharmacol.* [En línea]. Vol 94, nº 1 (2004), pp:1–23. [Consulta: 04 julio 2016]

Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874104000856>

9. **DRAC, BARRETO M, INGELMO CJ, PUPPO S.** *Farmacología de benzodiazepinas, hipnóticos y ansiolíticos no benzodiazepínicos, psicoestimulantes, etanol y neuroactivadores cognitivos.* Teórico BZD [En línea]. (2003); pp: 1–27. [Consulta: 23 julio 2016]. Disponible en: <https://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/04/farmacologiade-las-benzodiazepinas-ansioliticos-hipnoticos-no-benzodiazepinicos-psicoestimulantes-y-neuroactivadores-cognitivos.pdf>

10. **GERÉZ PFG, GULLACE FA.** *Reproducción en animales de laboratorio 1 ° parte : RATA - RATÓN.* Técnicas para Bioterio IV [En línea]. (2011); [Consulta: 23 julio 2016]. Disponible en: <http://dpd.fvet.uba.ar/cartelera/00010199.pdf>

11. **GONZALES HECTOR G.** *Trastornos de ansiedad.* Revista de Neurofisiología Clínica. [En línea]. Vol. 1ro. (2014), pp: 240. [Consulta: 17 julio 2016]. Disponible en: rtasingularidad.com/events/libro_trastorno_de_ansiedad.pdf

12. **GRUPO DE TRABAJO DE LA GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA.** *Manejo de Pacientes con Trastornos de Ansiedad en Atención Primaria.* Guía de Práctica Clínica para el Manejo de Pacientes con Trastornos de Ansiedad en Atención Primaria. Madrid Plan Nac para el SNS del MSC [En línea]. Vol 28, nº 3 (2008), pp: 13-162 [Consulta: 04 julio 2016]. Disponible en: http://www.guiasalud.es/GPC/GPC_430_Ansiedad_Lain_Entr_compl.pdf

13. **INSTITUTO NACIONAL MENTAL S.** *Trastornos de Ansiedad.* Revista Inst Nac la Salud Ment [En línea]. Vol SP 09 nº 6001; (2009), pp:1–34. [Consulta: 05 julio 2016]. Disponible en: <http://www.nimh.nih.gov>.

14. **LUZ MARINA CARVAJAL-DE PABÓN, SANDRA TURBAY, LIZETH MARELLY ÁLVAREZ, ADALBERTO RODRÍGUEZ, JULIE MARITZA ALVAREZ, KARLA BONILLA, SARA RESTREPO MP.** *RELACIÓN ENTRE LOS USOS POPULARES DE LA GRANADILLA (Passiflora ligularis Juss) Y SU COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA.* Revista Scielo [En línea]. Vol 12, nº 2 (2014), pp:185–96. [Consulta: 04 julio 2016]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1692-35612014000200021&script=sci_arttext&tlng=en

15. **ANUEL J.** Lista de Especies de Passifloraceae de Colombia. *Redalyc.org*. [Internet]. Vol 1, n° 3 (2000), pp. 320-335. [Consulta: 14 junio 2016]. Available from: <http://www.redalyc.org/pdf/491/49110302.pdf>
16. **NAVARRO SARABIA F, MOREIRA NAVARRETE V.** *Estado actual del tratamiento de la artrosis*. Medicine (Baltimore) [En línea]. Elsevier; Vol 11 n° 46 (2013), pp:6-2741. [Consulta: 07 julio 2016]. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412\(13\)70693-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412(13)70693-0)
17. **NIN MS, COUTO-PEREIRA NS, SOUZA MF, AZEREDO LA, FERRI MK, DALPRÁ WL, et al.** *Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: Grooming microstructure and elevated plus maze tests*. Eur J Pharmacol [En línea]. Elsevier B.V. Vol 3 n° 684 (2012), pp:95–101. [Consulta: 26 julio 2016]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.03.038>
18. **PASTRANA JIMÉNEZ JI.** *Guía de ayuda a pacientes y familiares: Trastornos de ansiedad y estrés*. Fund Juan José López-Ibor Fund Arpegio. [en línea] Vol. 3 n° 1 (2007), pp 1–10. [Consulta: 18 mayo 2016]. Disponible en: http://www.guiasalud.es/GPC/GPC_430_Ansiedad_Lain_Entr_compl.pdf
19. **PELISSOLO A.** *Trastornos de ansiedad y neuróticos*. EMC - Tratado Med [En línea]. Vol 16 n° 4 (2012), pp:1–10. [Consulta: 07 julio 2016]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1636541012633972>
20. **PEREZ-VIZCAINO F, DUARTE J, JIMENEZ R, SANTOS-BUELGA C, OSUNA A.** *Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin*. Pharmacol Reports [En línea]. Elsevier; Vol 69, n° 1 (2009): pp: 67–75. [Consulta: 14 junio 2016] Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70008-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70008-8)
21. **POLANCO LA, VARGAS-IRWIN C, GÓNGORA ME.** *Modelos animales: Una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad*. Suma Psicol [En línea]. Vol 2 n° 18 (2012), pp: 141–8. [Consulta: 23 julio 2016]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/sumps/v18n2/v18n2a11.pdf>
22. **PUCHOL-ESPERANZA D.** Los trastornos de ansiedad: la epidemia silenciosa del siglo XXI. *Revista Psicología Científica.com*. Valencia; [en línea] Vol. 5 (2003), pp. 110–21. [Consulta: 19 mayo 2016]. Disponible en:

<http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesiseortiz/2016/05/22/Lopez-Gilda.pdf>

23. **REJÓN-ORANTES, PERDOMO R.** Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas. *Research Gate*. [En línea]. Vol 52, n° 1 (2011), pp: 1–7. [Consulta: 18 mayo 2016] Disponible en: <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/vnimedica/article/view/16039>
24. **REYES, TICAS J.** *Trastornos De Ansiedad Guia Practica Para Diagnostico Y Tratamiento*. Bibl virtual en salud Honduras [en línea] ... [En línea]. 2005;1–134. . [Consulta: 18 mayo 2016]. Available from: <http://www.bvs.hn/Honduras/pdf/TrastornoAnsiedad.pdf>.
25. **RICARDO DE LA VEGA, ANTONIO ZAMBRANO.** Cl USO, Administraci PDE. *Clonazepam. Pediamécum* [En línea]. (2010); pp: 1–5. [Consulta: 17 julio 2016]. Disponible en: <http://www.hipocampo.org/clonazepam.asp>
26. **ROJAS J.** Evaluación de la toxicidad del extracto metanólico de hojas de *Passiflora edulis* Sims (maracuyá), en ratas. Evaluación la toxicidad del Extr metanólico hojas *Passiflora edulis*. *Revista de Investigación UNMSM*. [en línea] Vol. 70, n° 3 (2009), pp 11-15. [Consulta: 19 mayo 2016]. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/937>
27. **RY SUMMA. PSIQUIATRÍA.** *Trastornos de Ansiedad*. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*. [En línea]. Vol 604, n° 604; (2012), pp: 497–507. [Consulta: 04 julio 2016]. Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/604/art11.pdf>
28. **SAUSED O ICC.** Universidad Autonoma de Ciudad Juarez. Com Editor Av. *Cuaderno de Trabajo*. *Ansiedad en estudiantes universitarios*. [En línea]. Vol 2 n° 172 (2012), pp1–16. [Consulta: 9 junio 2016]. Available from: <http://www.uacj.mx/DGDCDC/SP/Documents/avances/Documents/2008/Avances Irene Carrillo.pdf>
29. **SCHLATTER NAVARRO J, GAMAZO GARRÁN P.** *Trastornos de ansiedad (II). Fobias. Trastorno obsesivo-compulsivo*. *Medicine (Baltimore)* [En línea]. Elsevier; Vol 10 n° 85 (2011), pp: 41-5734. [Consulta: 07 julio 2016]. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412\(11\)70168-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412(11)70168-8)

30. **SIERRA JC, ORTEGA V, ZUBEIDAT I.** *Ansiedad, Angustia Y Estrés: Tres Conceptos a Diferenciar.* Rev Mal-Estar E Subjetividade / Fortaleza [En línea]. Vol 3, nº 1 (2003), pp:10–59. [Consulta: 04 julio 2016]. Disponible en: <http://pepsic.bvsalud.org/pdf/malestar/v3n1/02.pdf>

31. **SOLLOZO MI, CAMARENA E, LÓPEZ C.** Medicina tradicional : estudios preclínicos de plantas con propiedades ansiolíticas. Revisión - Ensayo. [En línea].Vol. 6, nº 2 (2011), pp: 78-84. [Consulta: 18 mayo 2016]. Disponible en <http://www.medigraphic.com/pdfs/residente/rr-2011/rr112c.pdf>

32. **STEVEN D. EHRLICH N.** *Passionflower* [Internet]. [en línea] United States of America, 26 junio 2014. [Consulta: 29 septiembre 2015. Disponible en: 2014. [Consulta: 22 junio 2016]. Disponible en: <https://umm.edu/health/medical/altmed/herb/passionflower>

33. **TOBERGTE DR, CURTIS S.** *Las plantas medicinales de Perú.*[En línea]. Journal of Chemical Information and Modeling. Vol. 53 (2013), pp: 1689-1699 p. [Consulta: 20 junio 2016] Disponible en: <http://www.reduniversitaria.es/ficheros/Plantas medicinales.LIBRO.pdf>

ANEXOS

Anexo A Recolección de la materia vegetal.



Anexo B Secado de la materia vegetal.



Anexo C Elaboración d extractos con el primer solvente. (Acetato de etilo)



Anexo D Secado del residuo del primer extracto, para la elaboración del siguiente extracto.



Anexo E Sonicación de los diferentes extractos.



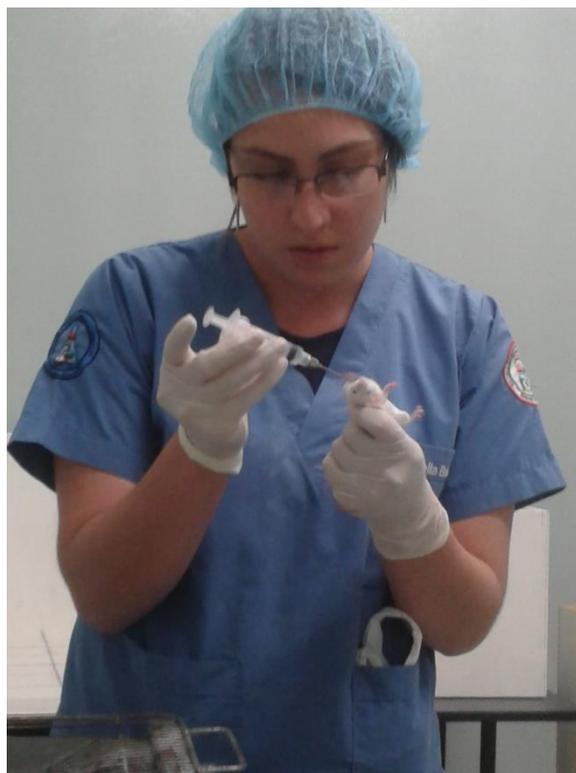
Anexo F Concentración de extractos en el sistema rotavapor.



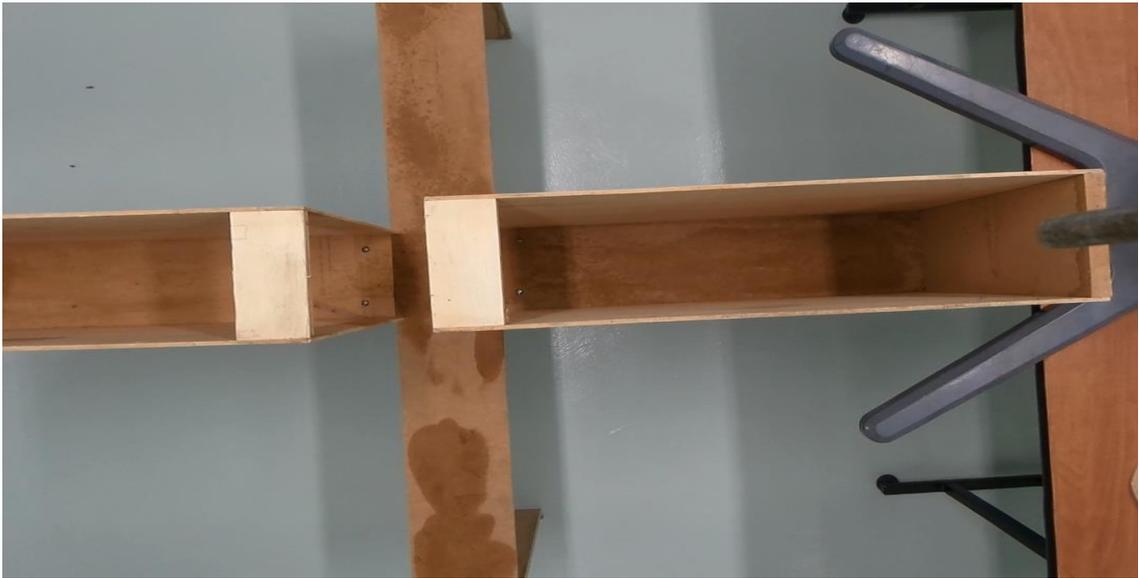
Anexo G Vehiculización de los extractos con propilenglicol al 15%.



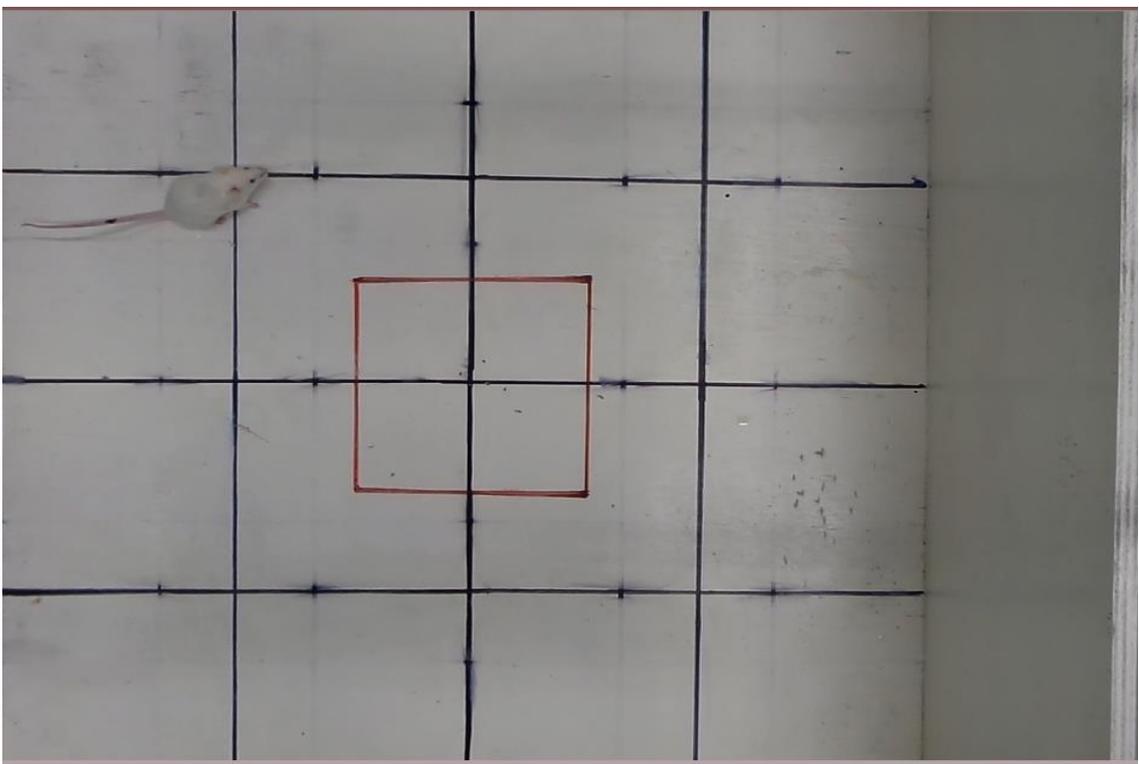
Anexo H Administración de 50mg/kg de extracto al ratón *Mus musculus*



Anexo I Determinación de la ansiedad en el modelo animal de laberinto en cruz elevado (EPM)



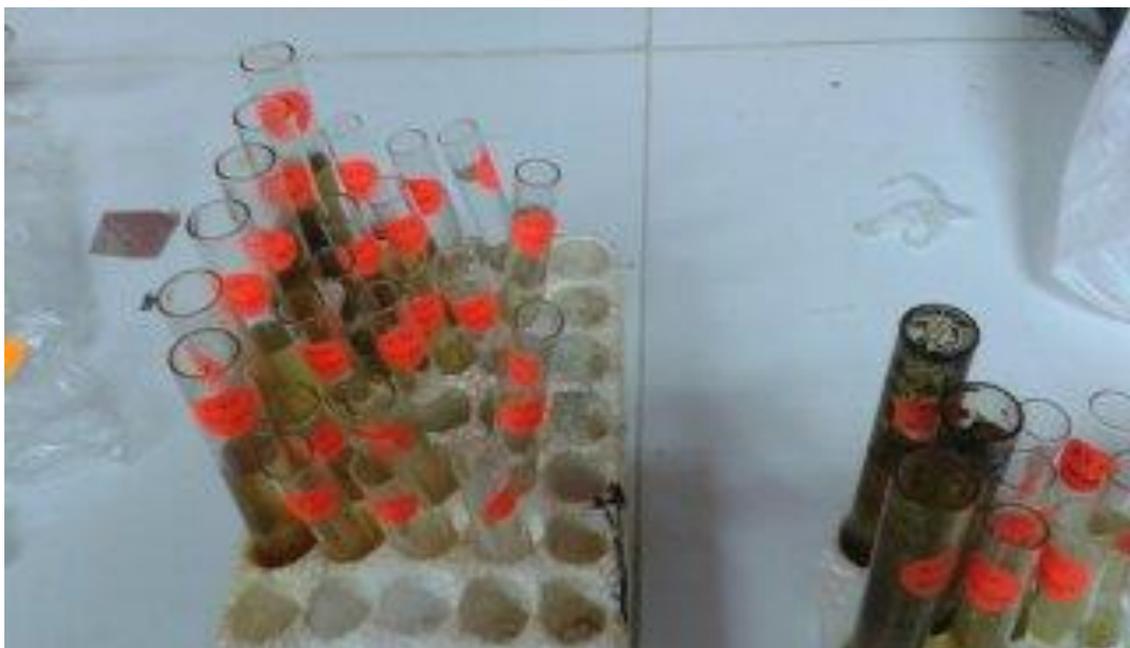
Anexo J Determinación de la ansiedad en el modelo animal OFT o ensayo de campo abierto



Anexo K Exposición de *Artemia salina* a los extractos.



Anexo L Conteo de *Artemia salina* después de 24 horas de exposición a los extractos para la determinación de toxicidad.



Anexo M Análisis de varianza del tiempo total de permanencia en los brazos abiertos

Grupo	Valor de p	Significancia	SD	Error estándar de la media	Mediana
Blanco	P<0,01	75,6	37,4	16,7	64
Control	P<0,01	175,8	51,7	23,1	190
H <i>P.mixta</i> AcOEt	P<0,01	54,6	21,8	9,7	50
F <i>P.mixta</i> AcOEt	P<0,01	59	24,1	10,8	72
H <i>P.ligularis</i> AcOEt	P<0,01	54,8	28,3	10,6	65
F <i>P.ligularis</i> AcOEt	P<0,01	39,6	20,4	8,1	48
H <i>P.mixta</i> MeOH	P<0,01	60,2	21	8,4	52
F <i>P.mixta</i> MeOH	P>0,05	116,2	61,3	27,4	114
F <i>P.ligularis</i> MeOH	P>0,05	116,2	35,8	16	95
H <i>P.ligularis</i> MeOH	P>0,05	113	63	28,2	127
H <i>P.mixta</i> H ₂ O	P<0,01	59	28	12,5	59
F <i>P.mixta</i> H ₂ O	P<0,01	58	26,2	11,7	52
H <i>P.ligularis</i> H ₂ O	P<0,01	37,6	27	12	39
F <i>P.ligularis</i> H ₂ O	P<0,01	45,8	10,1	4,4	45

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

AcOEt: Acetato de etilo

MeOH: Metanol

H₂O: Agua

SD: Desviación estándar

Anexo N Análisis de varianza del tiempo total de permanencia en el centro del modelo

Grupo	Valor de p	Significancia	SD	Error estándar de la media	Mediana
Blanco	P<0,01	15,6	9,3	4,1	17
Control	P<0,01	240,8	35,3	14,9	230
H <i>P.mixta</i> AcOEt	P<0,01	15,6	11,2	5	10
F <i>P.mixta</i> AcOEt	P<0,01	12,6	7,2	3,2	13
H <i>P.ligularis</i> AcOEt	P<0,01	10	5	2,2	10
F <i>P.ligularis</i> AcOEt	P<0,01	6,2	2,9	1,3	6
H <i>P.mixta</i> MeOH	P<0,01	6,4	5	2,2	5
F <i>P.mixta</i> MeOH	P>0,01	6,8	3,9	1,7	7
F <i>P.ligularis</i> MeOH	P>0,01	10,4	4	1,8	10
H <i>P.ligularis</i> MeOH	P>0,01	13,2	5,7	2,5	12
H <i>P.mixta</i> H ₂ O	P<0,01	8,8	3,6	1,6	10
F <i>P.mixta</i> H ₂ O	P<0,01	7,4	5,1	2,2	7
H <i>P.ligularis</i> H ₂ O	P<0,01	6	3,2	1,4	8
F <i>P.ligularis</i> H ₂ O	P<0,01	13	5,1	2,3	10

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

AcOEt: Acetato de etilo

MeOH: Metanol

H₂O: Agua

SD: Desviación estándar

Anexo O Análisis de varianza del tiempo total de permanencia en el cuarto claro

Grupo	Valor de p	Significancia	SD	Error estándar de la media	Mediana
Blanco	P<0,01	34	16	7,1	30
Control	P<0,01	267,6	24,2	10,8	268
H <i>P.mixta</i> AcOEt	P<0,01	44	21,2	9,5	42
F <i>P.mixta</i> AcOEt	P<0,01	111	41,7	18,6	101
H <i>P.ligularis</i> AcOEt	P<0,01	98,2	21,1	9,4	93
F <i>P.ligularis</i> AcOEt	P<0,01	54,8	38,9	17,4	53
H <i>P.mixta</i> MeOH	P<0,01	120	32,1	14,3	125
F <i>P.mixta</i> MeOH	P>0,01	103,6	36,6	16,3	114
F <i>P.ligularis</i> MeOH	P>0,01	106,4	62,1	27,8	130
H <i>P.ligularis</i> MeOH	P>0,01	162	59,8	26,7	130
H <i>P.mixta</i> H ₂ O	P<0,01	113	15,3	6,8	120
F <i>P.mixta</i> H ₂ O	P<0,01	136	48,1	21,5	131
H <i>P.ligularis</i> H ₂ O	P<0,01	67,8	25,3	11,3	78
F <i>P.ligularis</i> H ₂ O	P<0,01	138	24,2	10,8	147

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

AcOEt: Acetato de etilo

MeOH: Metanol

H₂O: Agua

SD: Desviación estándar

Anexo P Análisis de la varianza del tiempo que tarda en salir el ratón de retro de un tubo de 20 cm de longitud

Grupo	Valor de p	Significancia	SD	Error estándar de la media	Mediana
Blanco	P<0,01	19,8	17,7	7,9	16
Control	P<0,01	60	0	0	60
H <i>P.mixta</i> AcOEt	P<0,01	0	0	0	0
F <i>P.mixta</i> AcOEt	P<0,01	1,7	3,8	1,7	0
H <i>P.ligularis</i> AcOEt	P<0,01	1,6	3,6	1,6	0
F <i>P.ligularis</i> AcOEt	P<0,01	0	0	0	0
H <i>P.mixta</i> MeOH	P<0,01	1,3	3	1,3	0
F <i>P.mixta</i> MeOH	P>0,01	1	2,3	1	0
F <i>P.ligularis</i> MeOH	P>0,01	14	6,7	3	14,3
H <i>P.ligularis</i> MeOH	P>0,01	4,5	4,8	2,1	3,6
H <i>P.mixta</i> H ₂ O	P<0,01	8,7	6	2,7	12,8
F <i>P.mixta</i> H ₂ O	P<0,01	19,9	10,4	4,6	15
H <i>P.ligularis</i> H ₂ O	P<0,01	15,5	4,3	1,9	16,8
F <i>P.ligularis</i> H ₂ O	P<0,01	23,2	17,7	7,9	18,1

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

AcOEt: Acetato de etilo

MeOH: Metanol

H₂O: Agua

SD: Desviación estándar

Anexo Q Cantidad de *Artemia salina* que viven después de 24 horas de exposición al extracto

Toxicidad en *Artemia salina*

Variables	10 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm	Lc50
H <i>P.mixta</i> AcOEt	10	7	0	0	157 ppm
F <i>P.mixta</i> AcOEt	10	8	5	3	510 ppm
H <i>P.ligularis</i> AcOEt	9	8	4	0	240 ppm
F <i>P.ligularis</i> AcOEt	10	8	7	3	797 ppm
H <i>P.mixta</i> MeOH	4	0	0	0	7 ppm
F <i>P.mixta</i> MeOH	0	0	0	0	< a 10 ppm
F <i>P.ligularis</i> MeOH	8	4	1	0	73 ppm
H <i>P.ligularis</i> MeOH	8	7	6	3	644 ppm
H <i>P.mixta</i> H ₂ O	8	6	5	2	257 ppm
F <i>P.mixta</i> H ₂ O	10	7	4	0	235 ppm
H <i>P.ligularis</i> H ₂ O	9	7	4	1	277 ppm
F <i>P.ligularis</i> H ₂ O	10	7	5	2	426 ppm

Realizado por: Gisella Balseca, 2016

AcOEt: Acetato de etilo

MeOH: Metanol

H₂O: Agua