

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA PARA ACTIVIDAD ANSOLÍTICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Passiflora manicata* Y *Passiflora tripartita* EN RATONES *Mus musculus* MEDIANTE ADMINISTRACIÓN ORAL.

Fabián Silva, Dra. MsC. Susana Abdo, Bqf. MsC. Diego Vinueza

Escuela Superior Politécnica De Chimborazo

bqffabiansilva@gmail.com, abdosu@epoch.edu.ec, drvinueza@epoch.edu.ec

RESUMEN

Esta es una investigación basada en la determinación de dosis efectiva de la *Passiflora manicata* y *Passiflora tripartita*. Inicia con la preparación de extractos etanólicos a diferentes concentraciones, para investigar *In vivo*. El experimento emplea ratones *Mus musculus*, evaluando la actividad ansiolítica mediante cuatro test; los resultados obtenidos se comparan frente a un fármaco tradicional. Este estudio se llevó a cabo dentro del Laboratorio de Productos Naturales y Bioterio de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. El material vegetal fue recolectado, se secado, extraído con etanol 85% y lyofilizado. La parte flavónica de cada extracto fue analizada por TLC con fase móvil ácido acético: ácido fórmico: agua y cuantificada espectrofotométricamente en el UV. La actividad ansiolítica fue evaluada en 60 ratones agrupados cinco por grupo, se les administró cinco dosis de extracto en mg/kg una por grupo, un grupo blanco con propilenglicol un grupo control con clonazepam. La actividad ansiolítica fue evaluada con EPM, OFT, CR/DR y chimenea. Los parámetros medidos fueron: número de entradas a brazos, porcentaje de tiempo en brazos abiertos, tiempo en cuarto claro, número de cuadros recorridos, tiempo en el centro, tiempo que tarda en salir de la chimenea. El extracto lyophilizado de hojas de *P. manicata* contiene $661,667 \pm 3,803$ FTEQ /g de flavonoides y el de *P. tripartita* de $157,529 \pm 2,897$ FTEQ/g. En conclusión la dosis con mayor actividad ansiolítica del extracto lyophilizado de *P. manicata* fue de 300 mg/kg y 25 mg/kg para *P. tripartita*; constituyéndose en dosis eficaces para tratamiento de ansiedad en ratones.

Palabras Claves: TECNOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA INGENIERÍA, FARMACOLOGÍA, EXTRACCIÓN DE FLAVONOÍDES, ACTIVIDAD ANSOLÍTICA, TEST DE EVALUACIÓN ANSOLÍTICA, TAXO DE MONTE (*Passiflora manicata*), TAXO COMÚN (*Passiflora tripartita*), RATONES (*Mus musculus*).

ABSTRACT

This is an investigation based on the determination of the effective doses of the *Passiflora manicata* and common Taxo *Passiflora tripartite*. Begins with the preparation of ethanolic extracts in different concentrations for *In vivo* study. This experiment uses *Mus musculus* mice to evaluate the axiolytic activity through four tests, the results will be compared with traditional medicament. This study was carried out in the Laboratory of Natural Products and Vivarium of Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. The plant material was collected, dried, extracted with ethanol 85% and lyophilized. The flavonic part of each extract was analyzed through Thin Layer Chromatography (TLC) and quantified spectrophotometrically in the UV. The anxiolytic activity was evaluated in 60 mice grouped in five per group. It was administered five doses of extract on mg/kg one per group. A white group with propylene glicol and a control group with clonazepam. The anxiolytic activity was evaluated with Elevated plus maze (EPM), open field test (OFT), light/dark room and muscle relaxant activity (chimney). The measured parameters were the following: number of entrances to arms, percentage of time in open arms, time in clear room, number of squares traversed, time of staying in the center, time that it takes to leave the chimney. The lyophilized extract of *P. manicata* leaves contains $661,667 \pm 3,803$ FTEQ/g flavonoids and the *P. tripartite* 157.529 ± 2.897 FTEQ/g. In conclusion, the dose with higher anxiolytic activity of the lyophilized extract of *P. manicata* was 300 mg/kg and 25 mg/kg for *P. tripartite*; constituting effective doses for the treatment of anxiety in mice.

Key words: TECHNOLOGY AND ENGINEERING SCIENCES, PHARMACOLOGY, FLAVONOID EXTRACTION, ANXIOLYTIC ACTIVITY, ANXIOLYTIC EVALUATION TEST, WILD TAXO (*Passiflora manicata*), COMMON TAXO (*Passiflora tripartite*), MICE (*Mus musculus*)

2.2. Ansiedad

1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) aprecia que alrededor de 450 millones de personas alrededor del mundo sufren algún tipo de trastorno mental, siendo entre otros indicadores estresantes como el campo familiar, educativo, laboral y social; en el caso del último citado las cifras son superiores debido a la situación actual y al desabastecimiento de los servicios de salud para cubrir esta problemática, cuyos datos muestran su existencia dentro de la sociedad a nivel de la salud mental.^[1]

Es por esto que la búsqueda de tratamientos alternativos y la utilización de productos naturales se ve encaminada a la disminución de los efectos no deseados obtenidos con el uso de medicamentos de origen sintético, así plantas de la familia *Passifloraceae* son utilizadas empíricamente por poblaciones que consideran su uso como un calmante dando indicios hacia especies de esta familia que poseen cierto efecto ansiolítico. Especies como la *Passiflora manicata* que se halla principalmente en la zona subtropical de la provincia de Chimborazo, creciendo en forma silvestre a un lado de la carretera cerca al cantón Pallatanga y *Passiflora tripartita* típica de la zona andina de la misma provincia, encontrada a veces hasta como una planta ornamental en fachadas de algunas casas, crece en este tipo de clima, actualmente voluble de la región sierra del Ecuador.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Salud mental

Para poder conceptualizar correctamente a la salud mental partimos de la definición universal que hizo la OMS de la palabra "salud" que dicta: "Estado de completo bienestar mental, físico y social, y no meramente la ausencia de enfermedad o dolencia"^[2]

La salud mental de cada individuo se ve afectada por una diversidad de factores y experiencias como: la interacción social, estructuras y recursos de la sociedad y también los valores culturales, todas estas determinantes están influenciadas por la vida diaria, la escuela, la familia y el trabajo como experiencia personales que van a ser las que predominen en su salud mental.^[2]

La ansiedad puede considerarse como un sistema de alerta de un organismo en situaciones consideradas como amenazadoras, debido a que se relaciona con la percepción de amenaza y disposición de respuesta a ella. La ansiedad tiene como objetivo el advertir y generar la activación del organismo, movilizándolo ante situaciones probables o reales, de tal manera que pueda aflorar sin problemas de ellas.^[3]

La Clasificación Internacional de enfermedades CIE 10, clasifica como F06.4 trastornos de ansiedad y F41.1 trastorno de ansiedad generalizada.^[4]

Según el Ministerio de Salud Pública del Ecuador en el 2012, se lo considera como: "Un trastorno emocional caracterizado por una sensación subjetiva de malestar, de temor no especificado, que el paciente no puede explicar. Acompañado de episodios agudos de pánico, con etiología variada, generalmente en relación con factores exógenos". Se conoce que probablemente afecta al 5% de la población, particularmente a la población joven. En el paciente geriátrico, la ansiedad se puede presentar como un síndrome o en otros casos asociarse a la depresión o a la demencia. La depresión ansiosa es una manera de manifestación común de la ansiedad en la vejez con un 95% de la población de ancianos en estado depresivo los cuales presentan indicios de ansiedad; la ansiedad en su curso puede desembocar, a corto o largo plazo en depresión. Estos trastornos de ansiedad en general afectan a la población adulta y siendo más comunes en servicios ubicados dentro del primer mundo. Se la diagnostica más tempranamente con una media de 15 años de edad y la prevalencia se ubica entre los 25 y 45 años, obteniéndose que la población femenina sea la más afectada.^[5]

2.2.1 Tratamiento de la Ansiedad

El tratamiento de los diferentes trastornos de ansiedad va desde la medicación hasta tratamientos psicoterapéuticos o la mixtura de ambos. El diagnóstico diferenciado por parte de un médico es de vital importancia previa a cualquier tipo de tratamiento, tomándose en cuenta la combinación entre trastornos así como también la presencia de otra enfermedad la cual ya posea un tratamiento medicamentoso, que

pueda interferir de sobremanera en la evolución positiva del paciente.^[6]

2.2.2 Tratamiento No Farmacológico

La psicoterapia, considerada como un tratamiento no farmacológico, está basada en la comunicación terapeuta (psicólogo o médico) con el paciente, ha representado una alternativa de preferencia en la atención primaria que demostrado disminuir e incluso eliminar síntomas relacionados al trastorno de ansiedad. Este tratamiento implica la ayuda de un profesional para el manejo de la sintomatología, donde el terapeuta muestra una empatía por las ideas y sentimientos del paciente, lo que le permite expresar de mejor manera los criterios y emociones, y con esto el paciente se llega a aliviar y reconfortado sabiendo cual es el origen de la ansiedad. Los efectos terapéuticos que se esperan aparecen al cabo de varias sesiones de recuperación. Este tipo de tratamiento es tomado como eficaz ya que los pacientes son insertados de nuevo a la sociedad y tienen la capacidad de tomar control total de sus vidas.^[7]

2.2.3 Tratamiento Farmacológico

En los tratamientos farmacológicos la medicación prescrita mantiene los síntomas bajo control, lo que quiere decir que no los elimina definitivamente, estos tratamientos tienen como objetivo el alivio de síntomas, la prevención en casos de reincidencias y la evasión de posteriores repercusiones. Los psiquiatras o especialistas afines como: psicólogos, consejeros, trabajadores sociales; son los que prescriben la medicación, en algunos casos y están capacitados para ofrecer la psicoterapia o trabajar en conjunto con el propósito de obtener respuestas requeridas al tratamiento, el tratamiento del médico debe basarse en la edad, sexo, historial clínico, posibilidades de embarazo e informar acerca de los efectos secundarios y reacciones adversas que pudieran presentarse.^[8]

2.2.3.1 Benzodiacepinas

El grupo principal de agentes ansiolíticos es el de las benzodiacepinas, con su abreviación BDZ, son medicamentos que surgieron en la década de 1960, y que actúan preferentemente en el Sistema Nervioso Central (SNC), siendo la somnolencia el efecto secundario más frecuente. Debido a la necesidad de los pacientes de dosis más elevadas

luego de transcurrir algo tiempo, la prescripción se da por lapsos de tiempo cortos, en especial en personas con antecedentes de problemas sociales como son el alcoholismo o drogadicción, exceptuando pacientes con el trastorno de pánico que pueden ser medicados con benzodiacepinas por hasta un año.^[8]

2.2.3.1.1 Clonazepam

Es un fármaco que pertenece al grupo de las benzodiazepinas, que ejerce su acción sobre el Sistema Nervioso Central (SNC), que tiene propiedades ansiolíticas, anticonvulsionantes, miorrelajantes, sedantes, hipnóticas y estabilizadoras en el estado de ánimo, puesto que es notable su adicción y alta tolerancia, característica que comparte con el resto de las benzodiazepinas, es administrada breves lapsos de tiempo o emergencia es destinado a pacientes con trastorno bipolar.^[8]

2.3. Género Passiflora

2.3.1. *Passiflora manicata*

Esta variedad de Passiflora se encuentra adaptada en climas calurosos y con cierta cercanía al mar, su crecimiento se da con abundante presencia de luz, localizándose a lo largo de los Andes teniendo una altura promedio de 1200 a 2600 msnm para su desarrollo en suelos fértilles pero no necesariamente abonados.^[9]

Puesto que no se considera como comestible el fruto de la *P. manicata*, su consumo en estado inmaduro desencadena algunos efectos tóxicos y sicótropos, su coloración impide diferenciar entre los estados maduro e inmaduro. Las hojas de esta especie son utilizadas como relajante, en infusión en las zonas donde que abunda su crecimiento.^[10]

2.3.2. *Passiflora tripartita*

Especie característica de la cordillera Andina, su desarrollo puede darse a nivel costa así como también en la montaña. Está localizada en países como: Ecuador, Colombia y Brasil, que poseen anualmente precipitaciones que van entre 800 y 1500 mm y en altitudes de 200 a 3200 msnm. Su uso es exclusivamente alimenticio y en algunos casos, más que todo en la ciudad, es utilizada como ornamento de fachadas en viviendas.^[9]

3. METODOLOGÍA

2.3.3. Modelos animales para el estudio de la ansiedad

La metodología más efectiva para el estudio es por administración por vía oral a ratones, que también presentan los mismos efectos conductuales y psicológicos que los seres humanos, y posteriormente son sometidos a pruebas psicolepticas para poder determinar los niveles de estrés, temor y principalmente ansiedad. La utilización de animales de experimentación tiene como ventaja principal la utilización de sustancias obtenidas por análisis fitoquímico en pequeñas porciones. ^[11]

2.3.4. Modelos de respuesta condicionada

Estos modelos se caracterizan por la valoración a la capacidad de respuesta de un estímulo que obtiene respuesta específica a otro estímulo. Por lo general se realiza un estímulo de tipo aversivo, como por ejemplo una pequeña descarga eléctrica sobre el animal, el que manifiesta una cierta respuesta. El experimentador tiene un control muy preciso en niveles de conducta inicial en esta clase de modelos. Una de las principales desventajas que se presentan en este tipo de modelos proviene del enternamiento permanente que los individuos necesitan para la experimentación, ademas de la utilización de varios grupos control en el diseño experimental, para de esta manera desechar efectos no especificados en el tratamiento. ^[12]

2.3.5. Modelos de respuesta no condicionada

Los modelos de respuesta no condicionada tienen como objetivo encontrar una respuesta fisiológica producto de un estímulo, teniendo una superior eficacia neurobiológica. En este tipo de pruebas no es necesario el entrenamiento, privación de algún elemento de la alimentación, son rápidas, fáciles y con bajo costo, debido a ello presentan menos sensibilidad en procesos de motivación y sus respuestas espontáneas son basadas en la conducta del ratón. No obstante el estudio de la conducta en los animales de experimentación es más compleja en relación a la de los modelos condicionados. Las pruebas pertenecientes a estos modelos son: laberinto elevado en cruz, campo abierto, caja con cuarto claro y oscuro, interacción social, tabla de agujeros, contraste negativo, las cuales son por lo general las más utilizadas. ^[11]

La metodología utilizada en el estudio se resume en la Fig. 1 que representa el proceso del estudio en su totalidad:

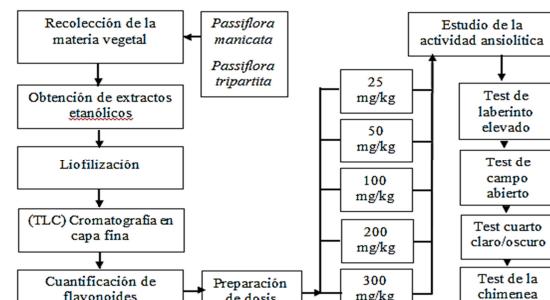


Fig. 1 Esquema del estudio
Fuente: F. Silva, 2016

3.1. Recolección de la materia vegetal

El punto de recolección de la *P. manicata*, está ubicado en la Provincia de Chimborazo, cantón Pallatanga, a una altura aproximada de 2670msnm; y de la *Passiflora tripartita*, se ubica en la provincia de Chimborazo, cantón Riobamba, a una altura aproximada de 2753msnm.

3.2. Preparación de extractos

Se preparó una solución etanólica al 85%, se tomó 50g de materia vegetal de cada una de las especies de pasiflora se realizó una mezcla 1:5 etanólica, reposó, se sonicó, se filtró la mezcla. Se congeló. ^[13]

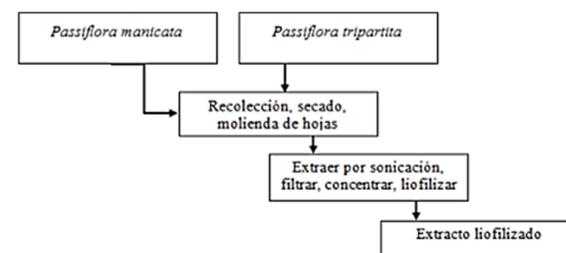


Fig. 2 Flujograma de la obtención de extractos
Fuente: F. Silva, 2016

3.3. Cromatografía en capa fina (TLC)

Para la realización de la cromatografía se preparó soluciones alcohólicas de 2000 ppm, luego se sembró 10 µL en la placa cromatográfica. Se introdujo en la cuba con fase móvil ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:26). Se reveló y observó en el UV. Se midieron los Rf. ^[13]

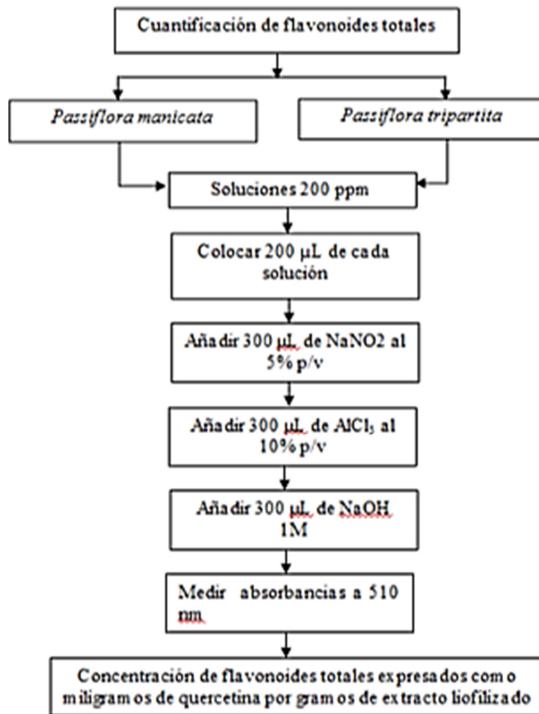


Fig. 3 Flujo de trabajo para la cuantificación de flavonoides totales

Fuente: F. Silva, 2016

3.4. Determinación de la actividad ansiolítica

La especie de animal experimental usado fueron ratones *Mus musculus* y su adaptación se dio por el tiempo de un mes. Su mantención fue de acuerdo a los principios básicos de las Buenas Prácticas de Laboratorio en el Bioterio. Se mantuvo control de parámetros como temperatura, humedad relativa, ciclo de luz-oscuridad.

La actividad ansiolítica se determinó en 60 ratones, con alimentación y agua *ad libitum* antes de los ensayos. El estudio siguió el mismo modelo en las dos tipos de pasifloras.

TABLA 1: División y codificación de grupos Passiflora manicata y Passiflora tripartita

	C	B	D1	D2	D3	D4	D5
<i>P. manicata</i> (PMn)	0,5 mg/kg	1,5 %	PM n1	PM n2	PM n3	PM n4	PM n5
<i>P. tripartita</i> (PT)	0,5 mg/kg	1,5 %	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5

FUENTE: F. Silva, 2016

3.5 Evaluación de actividad ansiolítica

Se realizaron 4 test de evaluación de actividad ansiolítica que se muestran en la Fig. 4:

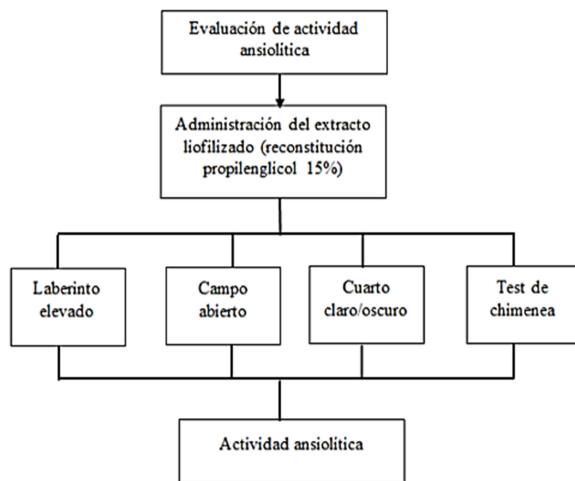


Fig. 4 Flujo de trabajo para la evaluación de actividad ansiolítica

Fuente: F. Silva, 2016

TABLA 2: Parámetros observados en el modelo de ansiedad

Test	EPM		CC/CO	Campo abierto	Chimenea
Variable respuesta	EBA	PTBAB	TCC	CRE	TCR
Medición de:	AL	AA	AA	AL	AA
					TM

FUENTE: F. Silva, 2016

Se utilizó el software IBM SPSS iniciando con pruebas de normalidad donde se estableció la distribución normal de la muestra. El análisis de dosis se realizó con el test Anova y post hoc HSD Tukey y Duncan según corresponda. Para el análisis comparativo de especies de passifloras se utilizó el test T- student para muestras independientes. Posterior al estudio los animales de experimentación fueron sacrificados con éter.

4. RESULTADOS Y DIFUSIÓN

4.1. Porcentaje de rendimiento

Los extractos etanólicos liofilizados de hojas de *P. manicata* y *P. tripartita*; se obtuvo los siguientes rendimientos:

TABLA 3: Porcentaje de rendimiento de hojas de *P. manicata* y *P. tripartita*

ESPECIE	PESO	PORCENTAJE
<i>P. manicata</i>	42,2 mg /g	4,22 %
<i>P. tripartita</i>	50,1 mg /g	5,01 %

Fuente: F. Silva, 2016(Rafaelli et al, 1997, p. 225) (Wagner & Blade, 1996, p. 230)

4.2. Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina nos dio los resultados aquí descritos:

TABLA 4: Rf obtenidos mediante cromatografía en capa fina

EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS	Nº	Rf
<i>P. manicata</i> (A)	1	0,71
	2	0,80
	3	0,90
<i>P. tripartita</i> (B)	4	0,54
	5	0,48
	6	0,15

Fuente: F. Silva, 2016

TABLA 5 Rf de posibles compuestos estándares

COMPUESTO	Rf
Vitexina	0,6-0,65
Isovitetexina	0,54
Isovitetexina-2''-O-ramnósido	0,41
Vitexina-2''-O-ramnósido	0,41
Vitexina-2''-O-glucósico	0,28
Isoorientina	0,46
Orientina	0,57
Schaftoside	0,80
Apigenina	0,90

Fuente: (Wagner & Bladt, 1996)

Realizado por: F. Silva, 2016

Haciendo relación los datos obtenidos con bibliografía de Wagner & Blade (1996) se presume que el compuesto número 2 correspondería a Schaftoside, el compuesto número 3 a Apigenina, el compuesto número 4 a Isovitexina y el compuesto 5 a Isoorientina.

Según un estudio de Rafaelli (1997) en *Passiflora incarnata* existe presencia de Schaftoside y comparándolo con el Rf de referencia en Wagner & Bladt (1996) el compuesto número 2 correspondería a schaftoside, concordando esto con la metodología utilizada para flavonas glicosiladas. [13]

4.3. Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales se realizó por espectrofotometría e interpolación de las absorbancias en una curva de calibración con estándar de quercetina.

TABLA 6 Resultados de cuantificación de flavonoides totales

EXTRACTO	FLAVONOIDEOS TOTALES EXPRESADOS COMO mg EQUIVALENTES DE QUERCETINA/g EXTRACTO LIOFILIZADO
<i>Passiflora. manicata</i>	661,667 ± 3,803
<i>Passiflora. tripartita</i>	157,529 ± 2,897

Media ± desviación estándar de 3 determinaciones.

Fuente: F.Silva, 2016

En anteriores estudios la cantidad fue de 55.17 mg ± 2,204 FTEQ/g en materia vegetal de hojas desecadas. [11]

4.4. Evaluación de la actividad ansiolítica

4.4.1. Laberinto en cruz elevado (EPM)

TABLA 7: Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos de número de entradas.

GRUPOS	Subconjunto para $\alpha = 0.05$	
	1	2
CONTROL	,6000	
T-D3	,8000	
Mn-D5	1,0000	
T- D1	1,0000	
T-D4	1,6000	
T-D2	1,8000	
Mn-D3	2,0000	
T-D4	2,2000	
Mn-D2	3,0000	
Mn-D1	3,2000	
T-D5	3,4000	
BLANCO		11,6000

Realizado por: F. Silva, 2016

TABLA 8: Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos de porcentaje de tiempo en brazos abiertos.

GRUPOS	Subconjunto para $\alpha = 0.05$		
	1	2	3
Mn-D5	0,0567		
Mn-D4	0,1967		
Mn-D1	0,2733		
Mn-D3	0,3667		
Mn-D2	0,3767		
BLANCO	4,3320		
T-D1		31,4000	
T-D3		32,6667	
T-D2		33,2667	
T-D5		38,0667	
T-D4		38,1333	
CONTROL			97,5200

Realizado por: F.Silva, 2016

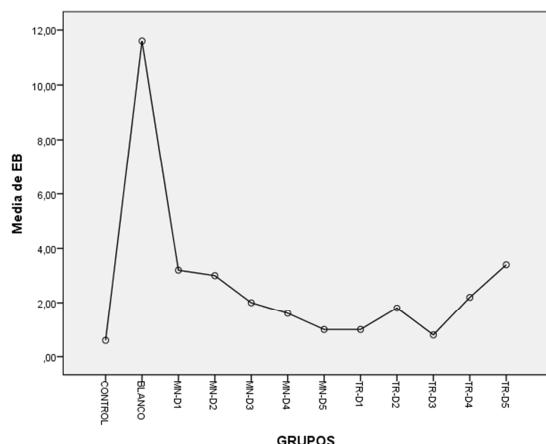


Fig. 5 Medias de número de entrada a brazos

Fuente: F. Silva, 2016

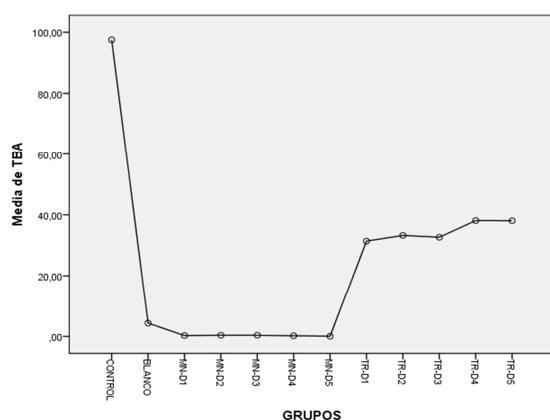


Fig. 6 Medias de porcentaje de tiempo en brazos abiertos

Fuente: F. Silva, 2016

En el número de entradas a brazos el análisis post-hoc HSD Tukey (Tabla 7); se forman 2 grupos homogéneos. Uno de ellos indica que estas dosis inducen depresión en la actividad motora.

Los tratamientos restantes se encuentran en el grupo homogéneo con el blanco indicando que en este test son dosis ansiogénicas elevando la movilidad del animal. El porcentaje de tiempo en brazos abiertos análisis post-hoc HSD Tukey (Tabla 8); se forman 3 grupos donde se observa que ninguna dosis forma grupo homogéneo con el control lo cual indica actividad insolitica considerable.

El Gráfico 5 y los análisis Post-Hoc se determina que en este test las dosis de extracto liofilizado de *P. tripartita* tienen un efecto ansiolítico mayor que el indicado extracto liofilizado de *P. manicata*. Se observa que la actividad ansiolítica es directamente proporcional a la concentración de los extractos liofilizados.

En cuanto al efecto que genera los extractos liofilizados de *P. manicata* y *P. tripartita* en el número de entradas a brazos, se podría considerar como sedativas, debido a que actúan directamente sobre la actividad motora. El porcentaje de tiempo en brazos abiertos las dosis que corresponden al extracto liofilizado de *P. tripartita* que es más próxima al control. Se observa en el Gráfico 6, que la media de todas las dosis ninguna se le atribuye ningún efecto ansiolítico.

4.4.2. Cuarto claro/oscuro

TABLA 9: Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos de tiempo en cuarto claro

GRUPOS	Subconjunto para $\alpha = 0.05$	
	1	2
BLANCO	0,9300	
Mn-D3	1,0200	
Mn-D2	1,2200	
T-D2	1,5600	
T-D5	1,6133	
T-D4	1,6567	
Mn-D1	1,7100	
T-D1	1,9967	1,9967
T-D3	2,1233	2,1233
M-D4	2,2633	2,2633
M-D5	2,8500	2,8500
CONTROL		4,8200

Realizado por: F. Silva, 2016

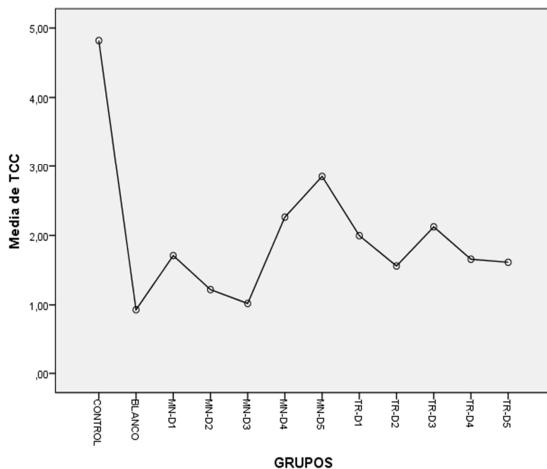


Fig. 7 Medias de tiempo en cuarto claro
Fuente: F. Silva, 2016

Según se muestra existe diferencia significativa. El estadístico Post-Hoc Tukey, muestra el grupo control las dosis de extracto de *Passiflora*

El extracto liofilizado de *P. tripartita* demuestra actividad ansiolítica difiriendo en dos de las dosis pero con repetición en una de ellas comparado con el test de laberinto elevado expresado como porcentaje de tiempo en brazos abiertos.

4.4.3. Campo abierto

TABLA 10 Test post-hoc Duncan de grupos homogéneos de cuadros recorridos

GRUPOS	Subconjunto para $\alpha = 0.05$	
	1	2
CONTROL	14,2000	
T-D1	42,8000	42,8000
Mn-D3	48,0000	48,0000
Mn-D5	48,6000	48,6000
T-D3	55,4000	55,4000
Mn-D1	56,6000	56,6000
Mn-D4	57,6000	57,6000
T-D2	60,4000	60,4000
Mn-D2	61,2000	61,2000
T-D5		80,0000
T-D4		82,8000
BLANCO		85,8000

Realizado por: F. Silva, 2016

TABLA 11 Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos de tiempo en el centro

GRUPOS	Subconjunto para $\alpha = 0.05$	
	1	2
CONTROL	,0000	
MN-D2	,0100	
TR-D2	,0100	
MN-D3	,0267	
TR-D3	,0280	
MN-D1	,0367	
TR-D1	,0440	
TR-D4	,0660	
MN-D4	,0667	
TR-D5	,1020	
MN-D5	,1033	
BLANCO		,3140

Realizado por: F. Silva, 2016

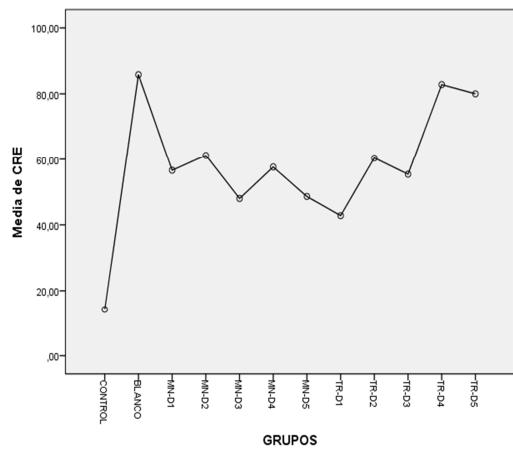


Fig. 8 Medias de cuadros recorridos en campo abierto
Realizado por: F. Silva, 2016

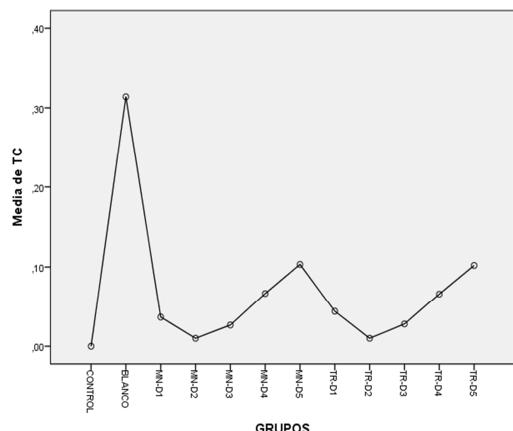


Fig. 9 Medias de tiempo en el centro
Realizado por: F. Silva, 2016

En el extracto liofilizado de *P. manicata* y *P. tripartita* son las que muestran mayor depresión en la actividad locomotora en cuadros recorridos, con mayor número de dosis, resultados que concuerdan con el número de entradas a brazos del EPM, exhiben actividad ansiolítica en tiempo en el centro, tiempo en cuarto claro y porcentaje de tiempo en brazos abiertos.

4.4.4. Test chimenea

TABLA 12 Test post-hoc HSD Tukey de grupos homogéneos de tiempo que tarda en salir

GRUPOS	Subconjunto para $\alpha = 0.05$	
	1	2
T-D1	0,2067	0,5433
T-D2	0,2067	0,7200
BLANCO	0,2400	0,7433
T-D4	0,5433	0,8000
T-D5	0,7200	0,8100
T-D3	0,7433	0,9433
Mn-D3	0,8000	0,9600
Mn-D5	0,8100	1,0000
Mn-D1		1,0200
Mn-D4		0,181
CONTROL		
Mn-D2		

Realizado por: F. Silva, 2016

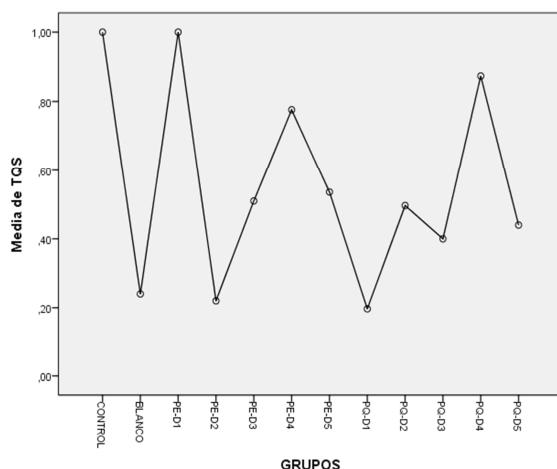


Fig. 10 Medias de tiempo que tarda en salir
Realizado por: F. Silva, 2016

Tienen un efecto miorrelajante por presentar una media mayor de 0,5 minutos según Vogel, 2002; donde manifiesta que el animal debe salir del tubo en máximo de 0,5 minutos en condiciones normales.

Los variables respuesta de todas las dosis del extracto de *P. manicata* después de la administración, indica que existe efecto en la actividad ansiolítica y en la locomoción los cuales son representativos, y la más destacable sobre la actividad locomotora es a 300 mg/kg, induciendo a los animales una depresión apreciable con una actividad ansiolítica que destacable con el clonazepam que fue el fármaco control utilizado en el experimentación.

La administración de dosis bajas no modifica la actividad locomotora, teniendo un efecto ansiogénico notable, lo que en las dosis altas generan lo contrario alterando significativamente a la actividad locomotora. Por lo cual se determina que, la administración de 300 mg/kg en ratones *Mus musculus* disminuye la ansiedad sin tener efecto sobre su locomoción.

5. CONCLUSIONES

- Las hojas de *Passiflora manicata* tuvo el 4.22% de rendimiento y el de *Passiflora tripartita* el 5.01%. La cuantificación de flavonoides de *P. manicata* fue de $661,667 \pm 3,803$ FTEQ /g de extracto liofilizado en *P. tripartita* es de $157,529 \pm 2,897$ FTEQ/g de extracto liofilizado.
- Cualitativamente mediante la CCF en el extracto liofilizado de *Passiflora manicata* se evidenció la posible presencia de shaftoside y apigenina y en *Passiflora tripartita* la posible presencia de isovitexina e isoorientina.
- La dosis efectiva de la actividad ansiolítica del extracto liofilizado de *P. manicata* es de 300 mg/ kg y en *P. tripartita* es de 25 mg/ kg, determinado por los porcentajes de tiempo en brazos abiertos y tiempo en el cuarto claro. Donde se determina actividad miorrelajante, en el test de chimenea, no muestra depresión en la actividad locomotora lo que constata con el número cuadros recorridos y número de entradas a brazos. Por lo que se pueden

considerar como dosis con efecto ansiolítico y que no tienen efecto alguno sobre la actividad motora de los animales de experimentación.

- Existe diferencia significativa para la actividad ansiolítica entre los extractos liofilizados y entre las dosis de *P. manicata*, *P. tripartita*, basada en el test t-Student.

6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda una capacitación previa a los ensayos que se realizan con los animales de experimentación.
- Sería de gran interés que se tome en cuenta los compuestos encontrados cuyos Rf no se citan en bibliografía.
- Se invita a un estudio toxicológico en animales de experimentación más grandes para de esta manera poder continuar con estudios clínicos en seres humanos.

REFERENCIAS

- [1] KHON , Robert; et al. *La brecha terapéutica en la atención de salud mental*; [En línea] 2010; http://www.who.int/bulletin/volumes/82/11/khon_1104abstract/es/.
- [2] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Tratamiento farmacológico de los trastornos mentales en la atención primaria de salud*; [pdf]; 2010; pp. 10-15; http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44095/1/9789241547697_eng.pdf
- [3] MADRID MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO. *Guía de Práctica Clínica para el Manejo de Pacientes con Trastornos de Ansiedad en Atención Primaria*; [En línea]; 2010; pp. 22-3; <https://www.madrid.org/lainentralgo>.
- [4] CIE 10. *Clasificación Internacional De Enfermedad*; [En línea]; 2016; http://www.psicomed.net/principal/cie10_indici.htm
- [5] ECUADOR MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. *Prioridades de Investigación en Salud 2013-2017*; [pdf]; 2016.; pp. 3-24; [https://www.ucuenca.edu.ec/images/facu_medicina/Investigacion/prioridades_investigacion_salud2013-2017%20\(1\).pdf](https://www.ucuenca.edu.ec/images/facu_medicina/Investigacion/prioridades_investigacion_salud2013-2017%20(1).pdf).
- [6] BROWN, Eric; et al. “Evaluation of the anxiolytic effects of chrysin, a *Passiflora incarnata*, in the laboratory rat”. *AANA Journal*; [en línea]; 2007; pp. 333-337; http://www.aana.com/newsandjournal/Documents/passiflora1007_p333-337.pdf
- [7] CARVAJAL-DE PABÓN, Luz; et al. “Relación entre los usos populares de la granadilla (*Passiflora ligularis* Juss) y su composición Fitoquímica”. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*; [En línea]; 2014; pp. 185-196. <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v12n2/v12n2a21.pdf>
- [8] ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. INSTITUTO NAC; *Trastornos de Ansiedad*; [pdf]; 2009; pp. 5-27; http://ipsi.uprrp.edu/opp/pdf/materiales/ansiedad_esp.pdf.
- [9] SÁNCHEZ, Luis. “Estudio Etnobotánico, Macro y Micro-Morfológico de Plantas del Género *Passiflora* Utilizadas como Sedantes En La Provincia De Chimborazo”; [TESIS] (Pregrado); 2016; pp. 21-24
- [10] BONILLA, Anahí; “Estudio fitoquímico y actividad antioxidante in vitro de hojas y flores de *Passiflora manicata*” [TESIS] (Pregrado); 2016; pp. 36-48
- [11] IDROBO, Tatiana, “Evaluación ansiolítica comparativa por solventes de los extractos de hojas flores de *Passiflora manicata* y *Passiflora tripartita* mediante administración vía oral en ratones *Mus musculus*”; [TESIS] (Pregrado); 2016; pp. 18-44
- [12] ROMERO, Maricruz. “Evaluación comparativa de la actividad ansiolítica de los extractos de hojas y flores de *Passiflora quadrangularis* y *Passiflora edulis* en ratones *Mus musculus* por administración oral”; [TESIS] (Pregrado); 2016; pp. 15-48
- [13] WAGNER, Hildebert & BLADE, Sabine. *Plant Drug Analysis*; 2^a ed;1996; pp 330-331