

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA



TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
MÉDICO CIRUJANO

EFFECTO ANSIOLÍTICO *IN VIVO* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *PASSIFLORA*
***SALPOENSE* (PASSIFLORACEAE)**

AUTOR: LEIVA SALINAS MILAGROS JOSELYN

ASESOR: DR. MOYA VEGA VÍCTOR RAÚL

CO-ASESORES: DRA. MEJÍA DELGADO ELVA MANUELA
DR. OBERTI JUAN CARLOS

TRUJILLO – PERÚ

2018

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
ESCUELA DE MEDICINA HUMANA

**“EFECTO ANSIOLÍTICO *IN VIVO* DEL EXTRACTO ETANÓLICO
DE *PASSIFLORA SALPOENSE* (PASSIFLORACEAE)”**

Por:

Milagros Joselyn Leiva Salinas
PARA OBTAR EL TÍTULO DE MÉDICO CIRUJANO

JURADO CALIFICADOR:

Dra. OFELIA CORDOVA PAZ SOLDAN
Presidenta

Dra. JENIFFER ARCILA DIAZ
Secretaria

Dra. ANA RAMIREZ ESPINOLA
Vocal

DEDICATORIA

*A Dios por darme salud y vida para poder lograr
cada meta que me he propuesto porque ÉL me guía
para salir siempre adelante.*

*A mi madre, Gladis Salinas, que desde el cielo
me da la fortaleza para poder seguir adelante
a pesar de las dificultades.*

*A mi padre Segundo Leiva, que está conmigo
en cada paso que voy dando,
guiándome y aconsejándome en mi
formación profesional y personal.*

*A mis hermanos, Patricia y Luis porque gracias sus consejos
y vivencias del día a día
me siento motivada a seguir sus pasos
en mi camino profesional.*

*A mi Caba, porque ha llegado en el momento ideal
para darme mucho amor y alegría,
cambiándome la vida.*

AGRADECIMIENTOS

*Mi más sentido agradecimiento al
Dr. Moya Vega Víctor Raúl, Dra. Mejía Delgado Elva Manuela y
Dr. Oberti Juan Carlos por su gran ayuda y asesoría
en la realización de esta tesis.*

*A la Dra. Gloria Barboza y Virginia Palchetti
por el amable recibimiento
en la estadía en Argentina.*

ÍNDICE

ÍNDICE	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
I. INTRODUCCIÓN.....	8
II. MATERIAL Y MÉTODOS	18
III. RESULTADOS	26
IV. DISCUSIÓN.....	28
V. CONCLUSIONES.....	31
VI. RECOMENDACIONES	32
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXOS	36

RESUMEN

Objetivos: Evaluar el efecto ansiolítico *in vivo* del extracto etanólico de *Passiflora salpoense* (passifloraceae).

Material y métodos: Se trabajó con 20 ratones Balb/c que aleatoriamente fueron distribuidos en 4 grupos administrándoles por vía oral (VO) de la siguiente forma: G1: Grupo blanco 0,2 ml de solución salina, G2: Grupo diazepam 1mg/kg, G3: Grupo 50 mg/kg de extracto etanólico de *P. salpoense* y G4: Grupo 100 mg/kg de extracto etanólico de *P. salpoense*. Luego, a los ratones se indujeron a ansiedad usando la prueba de Murble burying Test o prueba de enterramiento de canicas.

Resultados: Los resultados demostraron que los grupos G3 y G4 disminuyeron de manera significativa el número de esferas enterradas con una media $9,60 \pm 1,82$ y $4,20 \pm 1,30$, respectivamente a comparación del grupo control blanco (G1) cuya media fue de $17,20 \pm 3,03$. Asimismo, los grupos G3 y G4, presentó una respuesta similar al grupo G2 cuya media fue de $3 \pm 0,71$.

Conclusiones: Por lo tanto, que se concluyó que las dosis 50 mg/kg y 100 mg/kg del extracto etanólico de *Passiflora salpoense* (Passifloraceae) disminuyen los niveles de ansiedad de forma significativa ($p < 0.05$).

Palabras clave: *Passiflora salpoense*, extracto etanólico, ansiedad, Murble burying test.

ABSTRACT

Objective: Evaluate in vivo the anxiolytic effect of the ethanolic extract of *Passiflora salpoense* (Passifloraceae).

Material and methods: A prospective, transversal, preclinical in vivo. It was used 20 Balb/c mice that were randomly distributed in 4 groups for administering them orally in the following way: G1: white group 0.2 ml saline solution, G2: group diazepam 1 mg/kg, G3: group 50 mg/kg of ethanolic extract of *P. salpoense*, and G4: group 100 mg/kg of ethanolic extract of *P. salpoense*. Then, the mice were induced to anxiety using the Marble burying test.

Results: G3 and G4 groups significantly decreased the number of buried spheres with a mean of 9.60 ± 1.82 and 4.20 ± 1.30 , respectively compared to the white control group (G1) whose mean was 17.20 ± 3.03 . Likewise, the G3 and G4 groups presented a response similar to the G2 group whose mean was 3 ± 0.71 .

Conclusions: The doses 50 mg/kg and 100 mg/kg of the ethanolic extract of *Passiflora salpoense* significantly reduce anxiety levels ($p < 0.05$).

Keywords: *Passiflora salpoense*, ethanolic extract, anxiety, marble burying test.

I. INTRODUCCIÓN

Los trastornos mentales abarcan el 30% de la carga mundial de enfermedades no mortales. La OMS determinó que en los servicios de emergencias se observa 1 de cada 5 personas están afectadas por ansiedad y depresión (1). Según la Asociación Psiquiátrica de América Latina (2), los trastornos más comunes son la ansiedad, depresión y quejas somáticas. Estos tienen mayor predominio en las mujeres y afectan 1 de cada 3 personas en la comunidad, siendo esto un problema serio para la salud pública (3, 4).

En el Perú, las enfermedades neuropsiquiátricas alcanzan el 17,5% del total de enfermedades con consecuencias mortales y no mortales ocupando el primer lugar y ocasionando 33,5 años perdidos por cada mil habitantes. En los estudios realizados por el Instituto Nacional de Salud Mental entre los años 2003 – 2014, mencionan que el 20,7% de mayores de 12 años de edad presentan algún tipo de trastorno mental. Estas prevalencias se encuentran mayormente en poblaciones de zonas urbanas de Ayacucho, Puerto Maldonado, Iquitos, Tumbes, Puno y Pucallpa. En la población estudiada, los trastornos más frecuentes fueron los episodios depresivos y trastornos de ansiedad con un promedio nacional de 7,6% y 5,9%, respectivamente (5).

El DSM-V de sus siglas en inglés *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, clasifica al trastorno de ansiedad en:

“Trastorno de ansiedad por separación, Mutismo selectivo, Fobia específica, Trastorno de ansiedad social, Trastorno de pánico, Ataque de pánico, Agarofobia, Trastorno de ansiedad generalizada, Trastorno

de ansiedad inducido por sustancias o medicación, Trastorno de ansiedad debido a otra afección médica, otros Trastornos de ansiedad especificado y Trastorno de ansiedad no especificado” (6).

La ansiedad se define como una sensación anticipada de daño o desgracias futuras, que suelen estar acompañados de sentimientos desagradables, así como también de síntomas somáticos. Se menciona que la ansiedad es una respuesta normal y adaptativa, que impulsa a la persona a adoptar ciertas medidas con el fin de disminuir las consecuencias de un posible daño (4). Cuando sobrepasa cierta intensidad, se vuelve desproporcionada y se convierte en patológica (7). Se diferencia del miedo, ya que este se presenta ante un peligro real, consiente y externo. La angustia, es una emoción compleja asociada a situaciones de desesperación, cuya característica principal es la pérdida de actuar voluntariamente ocasionando pérdida de su capacidad de reacción. Los síntomas que se asocian a la angustia son taquicardia, palpitaciones, dolor u opresión precordial, sudoración, entre otros. El estrés se diferencia de la ansiedad debido a que es la consecuencia del individuo de no poder responder adecuadamente a las demandas de su ambiente como por ejemplo ambiente físico (frío o calor extremos), ambiente social, entre otros. Sin embargo, para algunos autores los términos ansiedad y angustia son usados como sinónimos (8).

La génesis de la ansiedad está dada por un conjunto de estructuras cerebrales y neurotransmisores. Las regiones cerebrales involucradas son en su

mayoría, las que conforman el sistema límbico. Destacan la amígdala, hipocampo e hipotálamo, principalmente (9).

La amígdala tiene conexiones con muchas vías, siendo una de estas con el área gris periacueductal del tronco cerebral que le permitirá al individuo tener respuestas motoras de lucha, huida o paralizarse en el lugar. También, la amígdala tiene conexiones con el hipotálamo, estimulando al eje Hipotálamo-pituitaria-adrenal que secretará cortisol. Otro tipo de conexiones que presenta es con el locus coeruleus que dará respuestas autonómicas y cardiovasculares como incrementar el pulso y la presión sanguínea asimismo, prepara para la lucha/huida y la supervivencia ante amenazas (9).

Con respecto a los neurotransmisores, uno que está involucrado en la regulación de la ansiedad es el GABA (ácido γ -aminobutírico), cuyo receptor de mayor importancia es el GABA_A en el que actúan las benzodiazepinas. Al activarse este receptor, disminuye la excitabilidad neuronal y produce una respuesta inhibitoria. La serotonina es un neurotransmisor que está presente en la amígdala, así como en los circuitos CSTC (córtex prefrontal, estriado y tálamo) regulando el miedo y preocupación a través de las vías serotoninérgicas (10). Al administrarse la primera dosis, presenta un efecto relajante inmediato y si se quiere el efecto máximo, esto puede llevar varias semanas (11).

Las Benzodiazepinas (BZD) son los psicofármacos más utilizados en atención primaria (12). Estos fármacos tienen la ventaja de aliviar síntomas y sensaciones de ansiedad de manera eficaz (13); por otra parte, ocasiona

dependencia psíquica, física, tolerancia y síndrome de abstinencia (14), estos efectos secundarios, se dan a largo plazo por su consumo crónico (11). El abuso y dependencia a BZD representa un problema importante en aquellos pacientes que son ingresados a Programas de Salud Mental (15). Es por ello, que para evitar estas graves consecuencias que se presentan en aquellas personas en tratamiento con BZD, se deben buscar nuevas opciones terapéuticas con bajos niveles de dependencia.

La Organización Mundial de la Salud, propone objetivos sobre la medicina tradicional siendo estos la construcción de nuevos conocimientos, garantizando la calidad, seguridad, eficacia y uso adecuado de la medicina tradicional; asimismo, se busca la integración de esta en los servicios de salud (16). Es por ello que me permito explorar las propiedades de *Passiflora salpoense*.

Passiflora salpoense (Passifloraceae) llamada “puro puro”, es una nueva especie recientemente publicada del Norte del Perú. Mide 1,5–2 (-3) m de alto, ampliamente ramificada. Tallos viejos 4-5 angulosos, marrón claro, compactos y sin agrietamiento longitudinal. Sus hojas con alternas, simples, verde la superficie adaxial y seríceas la superficie abaxial. Tiene pedúnculo rollizo, verde pubescente y está rodeado por una densa cobertura de pelos simples. Las flores son solitarias, ligeramente horizontales, rojas sus pétalos. Las bayas son péndulas, oblonga, seríceas de 4-5 cm de largo por 4-4,5 cm de diámetro. Las semillas son numerosas, oblongas y rodeadas por un arilo anaranjado (ver anexo 1-2) (17).

Solamente ha sido encontrado en Shitahuara (al norte de Salpo), distrito Salpo, provincia Otuzco, región La Libertad, Perú. Los pobladores de la zona consumen sus frutos por tener un sabor exquisito y las cultivan por sus colores llamativos (17).

El género *Passiflora* presenta diversos metabolitos secundarios según cada órgano de la planta. En las hojas hay presencia de flavonoides, taninos, lactonas, grasas, triterpenos, cumarinas y saponinas; en las flores hay grasas, aceites, triterpenos, taninos, flavonoides y glicósidos cianogénicos. Estos metabolitos son los que le dan las propiedades medicinales a las plantas (18). Su importancia se basa en los efectos depresores del sistema nervioso central, basados en estudios en donde se demuestra su efecto ansiolítico (19) y, aplicados en estudios experimentales en donde se demostró la disminución de niveles de ansiedad en estudiantes antes de dar exámenes (20). Autores afirman que las *Pasifloras* presentan propiedad ansiolíticas similares a las BZD por su interacción con el receptor GABA_A subunidad α 2 (21).

Son pocas las sustancias estudiadas en los estudios clínicos. Varias revisiones bibliográficas han determinado el efecto de *Passiflora* en animales de experimentación, específicamente aquellos inducidos a ansiedad; es por ello, que todas esas investigaciones deben ser útiles para la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos a partir de plantas medicinales (22).

Para el estudio experimental de la ansiedad, se debe hacer uso de modelos experimentales, sea en el hombre o en animales. Usando humanos se puede aprender mucho más de las regiones del sistema nervioso y mecanismos involucrados, pero, por razones éticas se prefiere el uso de animales experimentales para un estudio con mayor profundidad (23).

El uso de modelos animales con ansiedad, ha sido una forma importante para valorar la eficacia farmacológica de plantas, que se podrían utilizar para el tratamiento de los trastornos de ansiedad (24). Para ello, es necesario que el ambiente en el que se encuentren los modelos animales, deben ser similares a la de los humanos, salvaguardando el trato de los animales de acuerdo a los protocolos en cuanto a manejo y uso de animales de laboratorio (25).

Es importante conocer, cómo actúa un animal ante una situación de peligro, pues a manera general, los animales presentan patrones conductuales adaptativos. Esto quiere decir, que ante la presencia de un depredador, su primera reacción es escapar evitando ser capturado y en caso no pueda hacerlo, permanecerá inmóvil. Cuando se va acercando el agresor, el ataque defensivo aumenta, así como también la vigilancia. Por cada proceso que pasa el animal en peligro, se va a ir adaptando y esta respuesta está directamente relacionada con el tipo de estímulo que se le presente (26).

Cuando los ratones están frente a un estímulo como electrodo o una fuente de luz potente, lo que hacen es tratar de ocultarse evitando ese estímulo,

a esto se le conoce como defensiva de enterramiento y la forma en la que lo hacen va a depender del material disponible para poder enterrarse. Si en caso no encontraran de donde proviene el peligro como en la prueba de campo abierto o en laberintos, lo que hacen es asumir una postura de atención, de acercamiento u otean; es decir, miran hacia un lugar lejano desde un lugar alto (26).

La validación de estos modelos se da en cuanto a la sensibilidad que presentan ante fármacos ansiolíticos; se dividen en dos grupos dependiendo del tipo de respuesta siendo estas respuestas condicionadas o no condicionadas. Los modelos de respuesta condicionada, presentan una respuesta específica ante un estímulo generalmente desagradable como una descarga eléctrica (27).

Los modelos de respuesta no condicionada, responden de manera espontánea a los estímulos nuevos sin la necesidad de entrenamiento previo. Se puede evaluar el miedo ante situaciones nuevas, en donde el sujeto de experimentación es expuesto en un espacio abierto, alto o con luces brillantes (26). Las ventajas de este modelo es que presenta cierta validez ecológica al ser una prueba sencilla y rápida, es económica debido a que no son necesarios el uso de equipos costosos, tiene cierta sensibilidad bidireccional y no se requiere de la privación de alimento, agua o aplicación de descargas eléctricas para el condicionamiento (28).

Soto & Alvarado, en su artículo científico titulado *“Efecto del extracto fluido de Passiflora edulis y las técnicas de libertad emocional EFT en el tratamiento de la ansiedad ante los exámenes”*, se realizó un trabajo

experimental en la cual participaron 48 estudiantes, divididos en tres grupos experimentales y uno control, los cuales a los grupos experimentales se les administró el extracto fluido de *Passiflora edulis* y al grupo control se administró placebo. Se demostraron que los niveles de ansiedad disminuyeron antes de los exámenes después de administrarles el tratamiento, siendo esta respuesta significativa ($p < 0.05$) (20).

Gil J., en su tesis titulada “Efecto del extracto etanólico de hojas de *Passiflora tripartita* (tumbo serrano) en la ansiedad en *Mus musculus* var. *albinus*”, trabajó con 20 especímenes a los cuales se les dividió en 4 grupos, administrando a un grupo solución salina, a otro grupo diazepam y los 2 grupos, el extracto etanólico. El resultado fue que a dosis de 200 y 100 mg/kg disminuyó significativamente la ansiedad en ratones evaluados por el método luz-oscuridad (29).

Caldas A. & Castillo E., en su tesis titulada “Efecto del extracto etanólico de hojas de *Passiflora tripartita* var. *mollissima* en ansiedad de *Mus musculus* var. *albinus*, evaluada por el método Luz-Oscuridad”, trabajó con 24 especímenes divididos en 4 grupos. A un grupo se le administró cloruro de sodio, a otro, diazepam y a dos grupos, el extracto. El resultado fue, que presenta efecto ansiolítico en los ratones, siendo la dosis de 100 mg/kg la de mayor efecto en la prueba “Marble burying (30)”.

Rea V., en su tesis titulada “Evaluación del efecto ansiolítico del extracto hidroalcohólico de flor de badea (*Passiflora quadrangularis*) en ratones

(*Mus musculus*)", realizó un estudio experimental en la cual trabajó con 18 ratones, divididos en 6 grupos compuestos por 3 ratones cada grupo. A estos grupos se les realizó 5 pruebas como la prueba del alambre, enterramiento de canicas, laberinto elevado cero, caja luz-oscuridad y campo abierto. El resultado fue disminución de los niveles de ansiedad en ratones siendo la concentración al 100% la de mayor efectividad (19).

En el presente estudio se pretendió estudiar la ansiedad, debido a que actualmente las cifras con respecto a la incidencia, hoy en día son alarmantes; pues, es uno de los trastornos que con mayor frecuencia se presenta en las personas a nivel mundial y nacional. Este trastorno, conlleva a alterar el aspecto personal y profesional de quienes lo padecen y, puede dar lugar a que se generen otros trastornos.

Se estudió por primera vez el efecto ansiolítico de la especie *Passiflora salpoense* (Passifloraceae), que por los antecedentes revisados previamente del género *Passiflora*, nos da noción de su efecto sobre la ansiedad. Por lo tanto, esta investigación nos abre las posibilidades de seguir estudiando las propiedades de esta planta y aplicarlos posteriormente en personas lo que permitirá ayudar a combatir este problema de salud que afecta en la vida cotidiana de muchas personas a nivel mundial.

Formulación del problema

¿Presenta efecto ansiolítico *in vivo* el extracto etanólico de *Passiflora salpoense* (Passifloraceae)?

Hipótesis

H0: El extracto etanólico de *Passiflora salpoense* (Passifloraceae) no posee efecto ansiolítico *in vivo*.

H1: El extracto etanólico de *Passiflora salpoense* (Passifloraceae) posee efecto ansiolítico *in vivo*.

Objetivos

General:

- Evaluar el efecto ansiolítico *in vivo* del extracto etanólico de *Passiflora salpoense* (Passifloraceae).

Específicos:

- Establecer dosis efectiva del extracto etanólico de *Passiflora salpoana* (passifloraceae).
- Medir el comportamiento *in vivo* mediante la prueba de enterramiento de canicas.
- Comparar el efecto ansiolítico *in vivo* del extracto etanólico de *Passiflora salpoense* (Passifloraceae) y diazepam.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Materiales y métodos

Población Dina o Universo

Ratones Balb/c.

Población de Estudio

Ratones Balb/c obtenidos del Instituto Nacional de Salud INS en Chorrillos-Lima.

2.2 Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Ratones albinos Balb/c, de 8-11 semanas de edad, con peso corporal entre 20 - 25 gramos.

Criterios de exclusión

- Ratones de edades superiores a 11 semanas y menores de 8 semanas de edad, con peso corporal mayor a 25 gr o inferior a 20 gr, ratones que presenten conductas agresivas durante el proceso experimental.

2.3 Muestra

Unidad de análisis y muestreo

Ratón de experimentación que será sometido a inducción de ansiedad.

Tamaño muestral

Para el tamaño de la muestra se empleará la siguiente fórmula estadística de acuerdo al tipo de estudio y variables:

$$n = \frac{(2)(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 (S^2)}{E^2}$$

Donde:

n: Es el número de observaciones mínimas que deben efectuarse en el estudio

Z_{α} = 1,96. nivel de confianza, determinando para el valor de α . Para una confianza del 95% ($\alpha=0,05$)

Z_{β} = 1,28. poder estadístico o potencia que se asigna a la prueba. Para un valor estadístico del 90% ($\beta=0,10$)

S: Desviación estándar asumida(31) = 150

E: El mínimo valor de la diferencia que se desea detectar(31) = 308

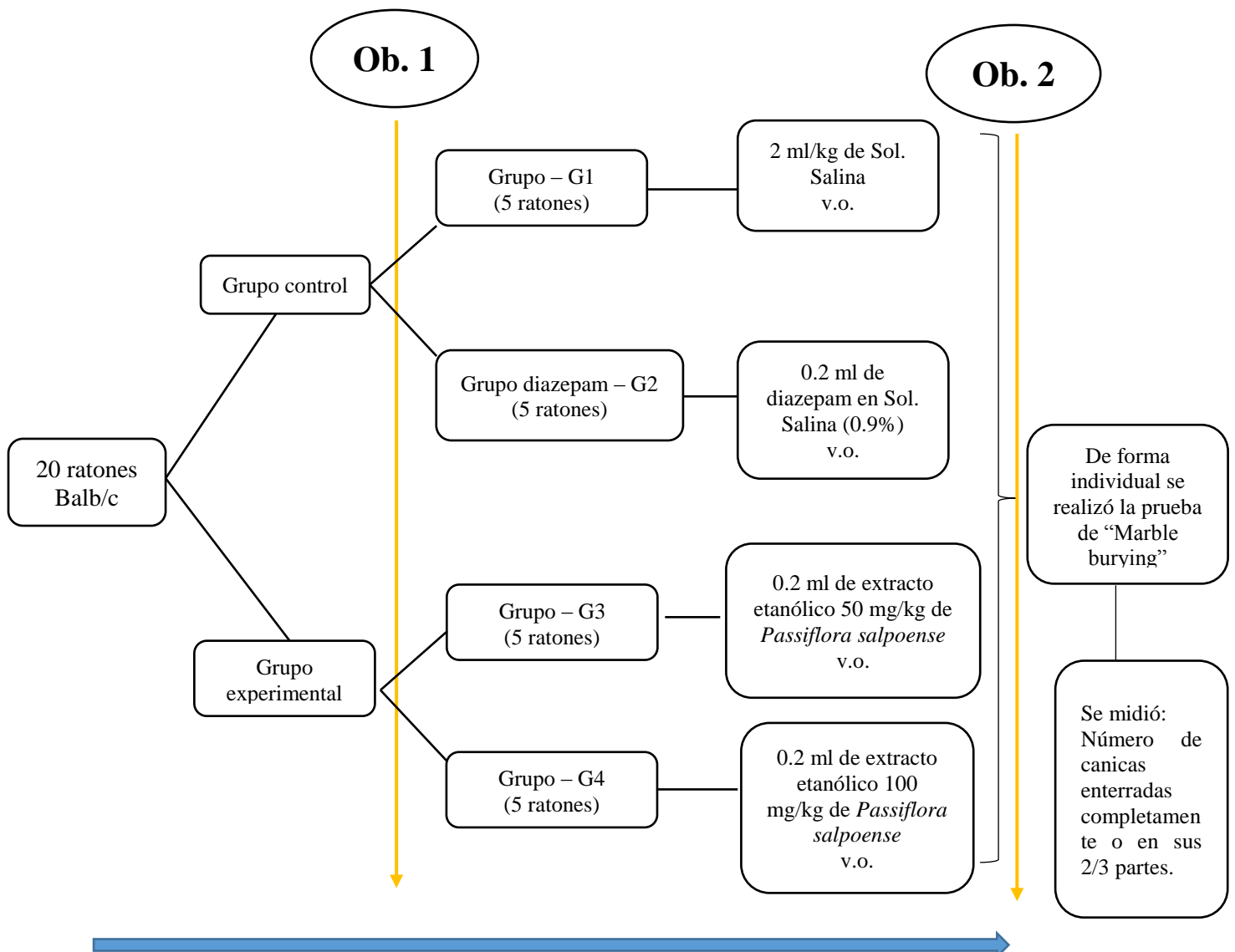
Al reemplazar los valores, se obtuvo: $n=4,98 \approx 5$. El resultado obtenido nos indica que se deberá trabajar con 5 ratones por grupo.

2.4 Métodos:

Tipo de investigación

Según el período en que se capta la información	Según la evolución del fenómeno estudiado	Según la interferencia del investigador en el estudio
Prospectiva	Transversal	Experimental

Diseño específico



Variables de estudio

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Tipo de variable		Escala de medición
				Según su naturaleza	Según su función	
Extracto etanólico de <i>Passiflora salpoense</i>	Producto de la maceración en alcohol, se obtiene un preparado de principios activos y sustancias inertes pertenecientes a la planta	Maceración en alcohol de la planta según concentraciones utilizadas	50 mg/kg 100 mg/kg	Cuantitativa	Independiente	Ordinal
Efecto ansiolítico <i>in vivo</i>	Sustancia que alivia o suprime la ansiedad sin producir sedación o sueño	Estado de inhibición de ansiedad determinado por el número de canicas enterradas completamente o en sus 2/3 partes.	Cumple No cumple	Cualitativa	Dependiente	Nominal

2.5 Procedimiento:

a. Obtención y preparación de la muestra

Obtención del material vegetal

Las muestras biológicas se obtuvieron del lugar denominado: Shitahuara (al norte de Salpo), distrito Salpo, provincia Otuzco, región La Libertad, Perú. La planta fue identificada en el Herbario Antenor Orrego (HAO), del Museo de Historia Natural y Cultural de la Universidad Privada Antenor Orrego de Trujillo, como *Passiflora salpoense* (Passifloraceae); una rama florífera, después del secado y montaje (ver anexo 3), se depositó oficialmente, en el Herbario HAO, con el número 20043 (ver anexo 4) y, recibiendo la respectiva constancia (ver anexo 5).

Preparación de la muestra

Se realizó la selección de las hojas que estaban en buenas condiciones, eliminando cualquier partícula extraña que pueden estar presentes. Se lavó el material vegetal con agua destilada y se acondicionó en papel Kraft por 4 días para el secado a temperatura ambiente y en la sombra (ver anexo 6). Una vez que las hojas estaban secas, se procedió a molerlas en un molino manual y se obtuvo polvo de la muestra, la cual fue puesta en 2 bolsas con cierre Ziploc para su posterior traslado al laboratorio de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, a cargo del Dr. Juan Carlos Oberti. (Ver anexo 7)

b. Elaboración del extracto etanólico

Para obtener el extracto etanólico, se procedió a realizar una extracción seriada con hexano, diclorometano y etanol extrayendo así compuestos con más polaridad. Se pesó 150 gramos de hojas molidas, la cual se colocó en un lixiviador hexano dejándolo macerar por 4 días. Luego, se obtuvo el extracto y se lo puso en un evaporador rotatorio hasta que el extracto se concentre y posteriormente fue vertido en un pequeño frasco sellado. Luego, en el lixiviador se le agregó diclorometano y se dejó macerar por un día. Al día siguiente, se procedió a poner el extracto obtenido en el evaporador rotatorio hasta concentrar el extracto y posteriormente se vertió en un frasco pequeño sellado. Finalmente, se agregó 750ml de etanol al 96% en el lixiviador y se dejó macerando por un día. Al día siguiente, el extracto obtenido se puso en el evaporador rotatorio hasta concentrar el extracto y se lo colocó en un frasco pequeño sellado. (Ver anexo N°7)

c. Fase de experimentación

Ambientación y cuidado de los ratones

Los ratones fueron puestos en un ambiente adecuado, evitando no hacer mucho ruido. Recibieron agua a voluntad y comida para animales. Para verificar que se habían adaptado, se mantuvo en observación por 7 días (Ver anexo N° 8).

Grupos a trabajar

Se seleccionaron 20 especímenes mediante el muestreo probabilístico de números consecutivos, se le asignó un número en forma aleatoria a cada espécimen y luego dividirlos en 4 grupos de 5 especímenes cada grupo.

Prueba de enterramiento de canicas (“Marble burying”) – preparación

Se hizo uso de una caja de plástico de 50 x 30 cm, con una capa de viruta de madera de 6 cm de profundidad, las mismas que eran de sus jaulas. Se ubicaron 20 canicas separadas de forma igual o equidistante mediante el uso de una hoja con agujeros; la iluminación fue con luz blanca de alta intensidad y potente (ver anexo 9).

Administración del extracto

Se procedió a administrar a cada grupo correspondiente las soluciones propuestas por vía oral (ver anexo 8). Con la ayuda de un asistente, se agarró al ratón por la parte posterior de la cabeza, evitando lesionarlo y se lo colocó en decúbito dorsal. Al estar en esa posición la boca del ratón

quedo semi abierta, lo cual ayudó a introducir la jeringa previamente habiéndole quitado la aguja.

Realización de la prueba de enterramiento de canicas

Se pusieron a los ratones en la caja, teniendo en cuenta que la prueba era de forma individual. Se dió inicio a la prueba que duró 30 minutos, una vez concluido el tiempo, el ratón fue sacado de la caja. Se procedió a contar el número de canicas enterradas en su totalidad, indicando ansiedad cuanto más sea el número de canicas enterradas (ver anexo 10).

2.6 Procesamiento y análisis de la información:

Estadística descriptiva: En el análisis de la información, se construyeron tablas de distribución de frecuencias con sus valores absolutos respectivos. Se calculó la desviación estándar y la media.

Estadística analítica: Para saber si hay actividad ansiolítica se hizo uso del análisis de varianza ANOVA y determinar si hay diferencias estadísticas entre los grupo control y experimentales. Luego, se hizo comparaciones múltiples a un intervalo de confianza del 95% con la prueba de Tukey HSD, permitiendo evaluar que grupos son diferentes y similares, y si hay o no actividad ansiolítica de la especie, y si es igual o no al grupo control positivo.

2.7 Aspectos éticos

En este estudio, al utilizar animales de experimentación, específicamente ratones, se tomaron en cuenta las normas y procedimientos éticos para el manejo de animales de laboratorio que se proponen en la Guía de manejo y cuidado de animales de Laboratorio: ratón propuesto por el Ministerio de salud y el Instituto Nacional de Salud (31).

III. RESULTADOS

TABLA 1. Medias (M) y desviaciones estándar (DT) de los grupos experimentales.

Grupos experimentales	Medias (M)	Desviaciones estándar (DT)
G1: Grupo control	17,20	3.03
G2: Grupo Diazepam	3,00	0.71
G3: Grupo 50mg/kg	9,60	1,82
G4: Grupo 100mg/kg	4,20	1,30

Fuente: Datos procesados en el Paquete Estadístico IBM SPSS Statistics 24.

Las puntuaciones medias de los grupos experimentales (Tabla 1), se puede observar que las medias de los grupos G2, G3 y G4 disminuyeron después de la administración de los tratamientos, siendo la disminución más baja el grupo G2 al cual se le administró diazepam, seguido del grupo G4 al cual se le administró 100 mg/kg y seguido de G3 cuya dosis fue de 50 mg/kg.

TABLA 2. Análisis estadístico de Murble burying (enterramiento de canicas) mediante la prueba de Tukey para la evaluación del efecto ansiolítico del extracto etanólico de *P. salpoense*.

Grupo	N	Tratamiento	Prueba de Tukey	Valor p (ANOVA)
G1: Grupo control	5	Suero fisiológico	A	
G3: Grupo 50mg/kg	5	50mg/kg	B	
G4: Grupo 100mg/kg	5	100mg/kg	C	p<0.05
G2: Grupo Diazepam	5	diazepam	C	

Fuente: Datos procesados en el Paquete Estadístico IBM SPSS Statistics 24.

En el análisis estadístico de Murble burying (Tabla 2) se observan las diferencias significativas ($p < 0.05$) en todos los grupos, tanto experimentales como en los grupos control en función a los tratamientos administrados. La prueba de Tukey, nos da como resultado letras posicionadas de manera diferente de acuerdo al número de canicas que han sido enterradas; es decir, las ratas tratadas con G1 enterraron un número significativamente mayor de canicas, seguidas de aquellas tratadas con G3. Las ratas tratadas con G2 y G4 enterraron una cantidad significativamente menor de canicas. No hay diferencias significativas entre las ratas tratadas con diazepam y 100 mg/kg.

IV. DISCUSIÓN

En la presente investigación, se evaluó el efecto ansiolítico del extracto etanólico de *Passiflora salpoense* (Passifloraceae) a dosis de 50mg/kg y 100mg/kg, con el modelo no condicionado de Marble burying. Con este modelo se pudo observar el patrón conductual en ratones con las dosis indicadas, comparando su efecto con el diazepam, que es un fármaco ansiolítico comprobado clínicamente.

En la tabla N°1. Se observó que el número de canicas enterradas varía en función de los tratamientos ($p < 0.05$). Con respecto al grupo G2 con diazepam, este disminuyó el número de canicas enterradas con una media de $3 \pm 0,71$, confirmando el efecto ansiolítico conocido por este fármaco y que concuerda con lo encontrado por Ariza S. *et al.*, en su investigación sobre el efecto de la Cumarina sobre el Sistema Nervioso Central. En ese estudio *in vivo*, se hizo uso de muchas pruebas no condicionales en la cual se comprobó los efectos ansiolíticos y sedantes del diazepam como grupo control comparando sus efectos con los de la Cumarina (33). Asimismo, el mismo efecto también fue encontrado por Gil J. en la cual usó al diazepam como grupo control positivo confirmando también su efecto ansiolítico en la prueba de enterramiento de canicas (29).

El resultado del extracto etanólico de *P. salpoense* a dosis de 50mg/kg (G3), se pudo observar que, disminuyó significativamente el número de canicas enterradas ($p < 0.05$) comparado con G1, cuya media fue de $9,60 \pm 1,82$. Pero, al

compararlo con G2 podemos ver que el efecto de diazepam es mucho mayor que la dosis de 50 mg/kg. Los resultados de los grupos G2, G3 y G4 a comparación de G1, presentan significancia $p < 0.05$ con un nivel de confianza del 95%, esto comprueba la diferencia de menor cantidad de canicas enterradas por G3 y G4 a diferencia de G1. Estos resultados son similares a los obtenidos por Gil J. en el que hizo uso de 20 especímenes divididos en 4 grupos, a los cuales a los grupos experimentales se les administró por vía intraperitoneal 1ml/kg de extracto etanólico de *Passiflora tripartita* a dosis de 200mg/kg y 100mg/kg a los ratones, para determinar los niveles de ansiedad utilizó la prueba de Murble burying test, concluyendo que las dosis administradas disminuyen significativamente los niveles de ansiedad (29). Asimismo, Caldas D. & Castillo E. en su investigación utilizaron 24 ratones divididos en 4 grupos a los cuales al grupo control se le administró 0.1 mL cloruro de sodio al 0.9%, al grupo control positivo, diazepam 1mg/kg/pc y a los grupos experimentales se les administró 50mg/kg y 100mg/kg del extracto etanólico de *Passiflora tripartita var. mollissima* (tumbo serrano), para determinar los niveles de ansiedad hicieron uso de la prueba de caja luz-oscuridad o Light/dark transition test for mice, concluyendo que a dosis de 50mg/kg y 100mg/kg disminuyó significativamente los niveles de ansiedad (30). Rea V. en su tesis de grado demostró el efecto ansiolítico del extracto hidroalcohólico de flor de badea (*P. quadrangularis*). Hizo uso de 18 ratones distribuidos en 6 grupos con 3 ratones cada grupo administrándole por vía oral los tratamientos a diferentes concentraciones de 100%, 65% y 30%. Para evaluar el comportamiento de su sistema nervioso hizo uso de las siguientes pruebas: la prueba del alambre, enterramiento de canicas, campo abierto, caja luz-oscuridad y laberinto elevado cero. Se pudo evidenciar la disminución de la

ansiedad al administrar *Passiflora quadrangularis* siendo la concentración más efectiva al 100% (19).

Respecto al resultado del extracto etanólico de *P. salpoense* a dosis de 100 mg/kg (G4). Se pudo observar que disminuyó significativamente el número de canicas enterradas ($p < 0.05$) con respecto al grupo G1 con una media de $4,20 \pm 1,30$. Esto se debe, a que la planta presenta metabolitos secundarios que le proporcionan el efecto sedante y ansiolítico. Actualmente, hay varios estudios en donde se ha reconocido a los flavonoides, como el metabolito que le da el efecto ansiolítico ya que tiene afinidad por el receptor GABA y ejerce una acción similar a las BZD. Esto se puede comprobar al comparar los grupos G2 y G4, en donde los resultados de la dosis de 100 mg/kg es casi similar a la del diazepam.

Los resultados obtenidos indican el efecto ansiolítico *in vivo* del extracto etanólico de *Passiflora salpoense* (Passifloraceae), abriendo paso a los nuevos estudios en la investigación tanto clínica como farmacológica. Por lo tanto, se constituye como una opción de medicina alternativa, eficiente y de bajo costo.

V. CONCLUSIONES

- Se estableció la dosis del extracto etanólico de *Passiflora salpoense* (Passifloraceae) a dosis de 50 y 100 mg/kg.
- Se midió el comportamiento *in vivo* mediante la prueba de Murble burying de acuerdo a las dosis establecidas.
- Se comparó el efecto ansiolítico *in vivo* del extracto etanólico de *Passiflora salpoense* (Passifloraceae) y diazepam, presentando la dosis de 100 mg/kg similar efecto que el diazepam a dosis de 2mg/kg.

VI. RECOMENDACIONES

- Repetir el estudio haciendo uso de una población mucho más significativa y poder determinar la acción farmacológica.
- Se recomienda seguir con las investigaciones de esta especie por ser nueva para la ciencia.
- Es importante determinar los niveles de toxicidad, reacciones adversas, interacciones farmacológicas y dependencia de *Passiflora salpoense*, ya que actualmente no hay referencia alguna de esos aspectos.
- Se debería de realizar e indagar más investigaciones de otras especies de *Passiflora* endémicas de nuestro país encontrando efecto farmacológico de toda la planta y no solamente en las flores.

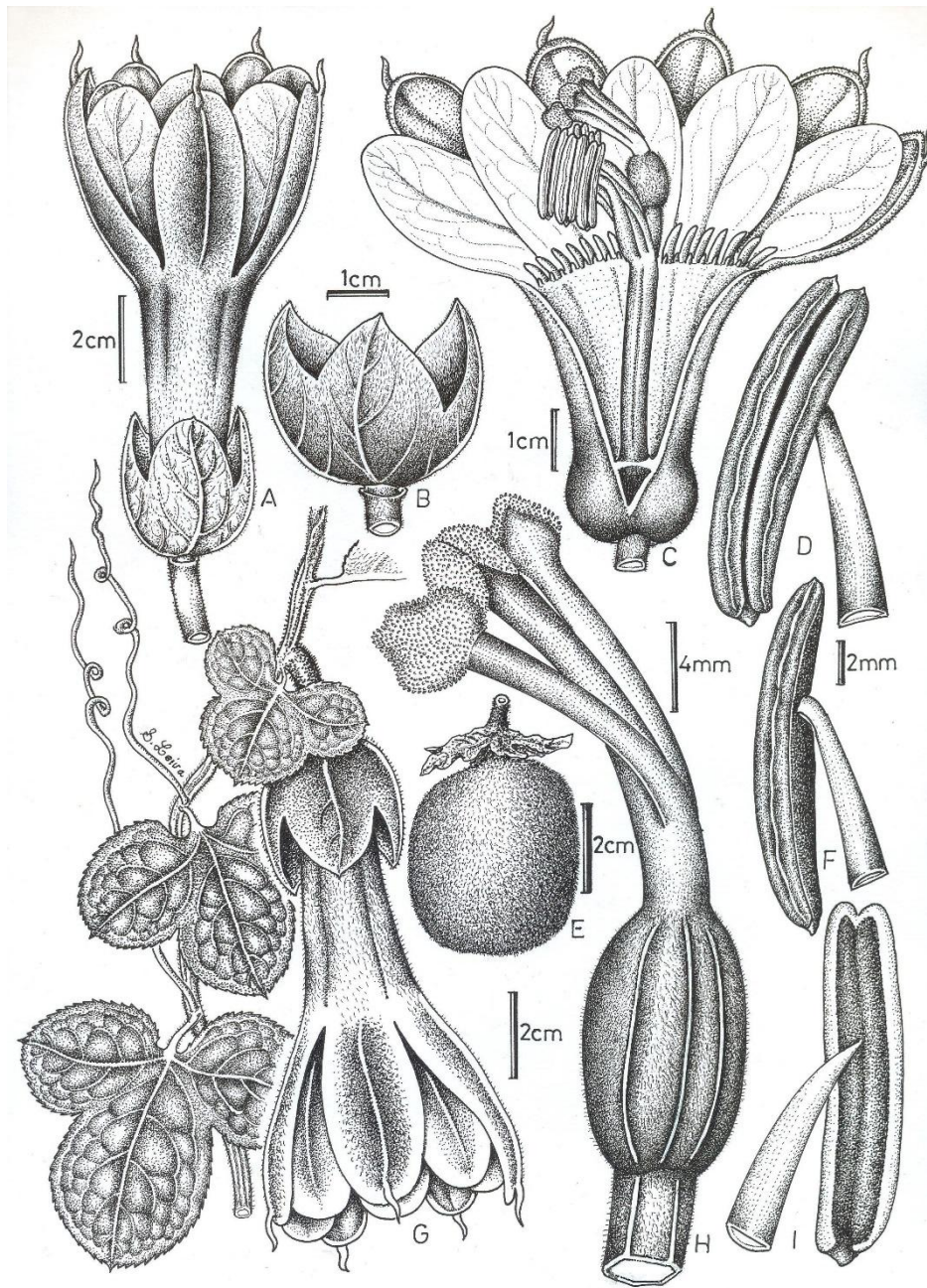
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. La inversión en el tratamiento de la depresión y la ansiedad tiene un rendimiento del 400% [Internet]. Ginebra: OMS; 2016. [citado 12 de junio de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/depression-anxiety-treatment/es/>
2. Asociación de psiquiatría [Internet]. [citado 30 de abril de 2018]. Disponible en: <http://www.apalweb.org/docs/smmujer.pdf>
3. Arenas M, Puigcerver A. Diferencias entre hombres y mujeres en los trastornos de ansiedad: una aproximación psicobiológica. *Escritos de Psicología*. 2009;3(1):20-9.
4. Sadock B, Alcott V, Ruiz P. *Manual de Psiquiatría clínica*. 4°. Philadelphia: Wolters Kluwer; 88-92 p.
5. Ministerio de Salud. Plan nacional de fortalecimiento de servicios de salud mental comunitaria 2018-2021. Lima, 2018.
6. American Psychiatric Association. Guía de consulta de los criterios diagnósticos del DSM-5® [Internet]. American Psychiatric Publishing; 2013 [citado 19 de mayo de 2018]. Disponible en: <http://psychiatryonline.org/doi/book/10.1176/appi.books.9780890425657>
7. Barrondo S, Martínez P, García-Portilla M. Trastornos de ansiedad en atención primaria. *Jano*. 2008;(1.714):9-14.
8. Sierra J, Ortega V, Zubeidat E. Ansiedad, angustia y estrés: tres conceptos a diferenciar. *Malestar e Subjetividad*. 2003;III(1):10-59.
9. Stahl S., Muntner N. & García A. *Psicofarmacología Esencial de Stahl: Bases neurocientíficas y aplicaciones prácticas*. Edición 4. 2014.
10. Cedillo B. Generalidades de la neurobiología de la ansiedad. *Revista Electrónica de Psicología Iztacala*. 20(1):239-51.
11. Stahl S, Grady M, Muntner N. *Psicofarmacología Esencial de Stahl. Guía del prescriptor*. 5°. España: Grupo Aula Médica, S.L.; 185-189 p.
12. Fernández R, Rupérez O, Hernando M, Delgado M, Sánchez R. Consumo de psicofármacos en atención primaria. *Aten Primaria*. 2013;19(1):47-50.
13. Díaz M. Las benzodiazepinas y sus efectos sobre la ansiedad. *Cultura*. 2007;31: 169-180.
14. López A., Aroche A., Bestard J. & Ocaña N. Uso y abuso de las benzodiazepinas. *MEDISAN* 2010; 14(4): 555.

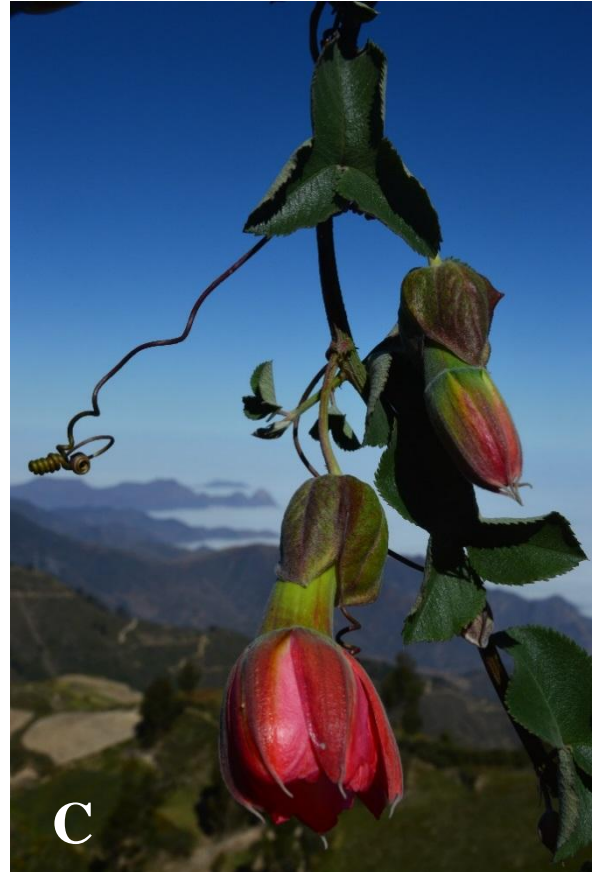
15. Olivera M. Dependencia a benzodiazepinas en un centro de atención primaria de salud: Magnitud del problema y orientaciones para el manejo integral. *Rev Chil Neuro-Psiquiat.* 2009;47(2):132-7.
16. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2013.
17. González S, Tantalean F. *Passiflora salpoana* (Passifloraceae) una nueva especie del Norte de Perú. *Arnaldoa.* 2015;22(1):35-48.
18. Garcés D. Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante in vitro de hojas y flores de *Passiflora quadrangularis*. [Tesis de Grado]. Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2016.
19. Rea V. Evaluación del efecto ansiolítico del extracto hidroalcohólico de flor de Badea (*Passiflora quadrangularis*) en ratones (*Mus musculus*). [Tesis de Grado]. Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2014.
20. Soto M, Arkin P. Efecto del extracto fluido de *Passiflora edulis* y técnicas de libertad emocional EFT en el tratamiento de la ansiedad ante los exámenes. *Medicina Naturista.* 2017;11(2):85-90.
21. Elsas S, Rossi D, Raber J, White G, Seeley C, Gregory WL, et al. *Passiflora incarnata* L. (Passionflower) extracts elicit GABA currents in hippocampal neurons in vitro, and show anxiogenic and anticonvulsant effects in vivo, varying with extraction method. *Phytomedicine.* 2010;17(12):940-9.
22. Sousa F, Melo C, Citó M, Vasconcelos S, Barbosa J, Viana G, et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* diciembre de 2008;18(4):642-54.
23. Pérez M. Dónde y cómo se produce la ansiedad: sus bases biológicas. *Ciencia.*2003: 16-28. [Internet]. [citado 30 de abril de 2018]. Disponible en: http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/54_2/como_produce_ansiedad.pdf
24. Sollozo-Dupont M, Camarena E, López-Rubalcava C. Medicina tradicional: estudios preclínicos de plantas con propiedades ansiolíticas. *El residente.* 2011;VI(2):78-84.
25. Leite M, Pérez-Acosta A. Modelos animales en psicopatología: ¿Una contribución o una ilusión? *Avances en psicología clínica latinoamericana.* 2001;19:37-50.
26. Gómez C, Saldívar-González J, Rodríguez R. Modelos animales para el estudio de la ansiedad: Una aproximación crítica. *Salud Mental.* 2002;25(1):14-24.

27. Polanco L, Vargas-Irwin C, Góngora M. Modelos animales: Una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad. *Suma Psicológica*. 2011;18(2): 141-148.
28. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 1985;14(3):149-67.
29. Gil J. Efecto del extracto etanólico de *Passiflora tripartita*. [Tesis de Pregrado]. Perú. Universidad Nacional de Trujillo, 2016.
30. Caldas D, Castillo E. Efecto del extracto etanólico de *Passiflora tripartita* var *mollissima* en ansiedad de *Mus musculus* var. *albinus*, evaluada por el método Luz- Oscuridad[Tesis de Pregrado]. Perú. Universidad Nacional de Trujillo, 2018.
31. Polo G. Efecto de *Lepidium meyenii* (maca), a dosis de 150 mg/kg y 300 mg/kg, sobre los leucocitos y la celularidad de órganos linfoides de ratones inmunosuprimidos [Tesis pregrado]. Perú. Universidad Nacional de Trujillo, 2014.
32. Fuentes F, Mendoza R, Rosales A, Cisneros R, Instituto Nacional de Salud (Peru). Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud; 2008.
33. Ariza S, Rueda D, Rincón J, Linares E, Guerrero M. Pharmacological effects on the central nervous system induced. *VITAE* 2007. 14 (2): 51-58.

ANEXOS



Anexo. 1. *Passiflora salpoense* S. Leiva & Tantalean. A, Flor en antesis; B. Calículo; C. Hipanto desplegado; D. Antera en vista ventral; E. Baya; F. Antera en vista lateral; G. Rama florífera; H. Gineceo; I. Antera en vista dorsal. (Reproducida con permiso de *Arnaldoa* 22 (1): 42, 2015, dibujado S. Leiva & M. Leiva 5806, HAO).



Anexo. 2. *Passiflora salpoense* S. Leiva & Tantaléan. A, C, D. Rama floríferas; B. Flor en antesis en vista ventral (Fotografías S. Leiva & M. Leiva 7032 HAO).



Anexo. 3. *Passiflora salpoense* S. Leiva & Tantaléan. A. Muestra de Herbario; B. Adecuando la muestra en la prensa botánica; C. Muestra en periódico; D. Secando la muestra en estufa eléctrica; E. Montaje de la muestra en el Herbario HAO (Fotografías S. Leiva & M. Leiva 7032 HAO).



Anexo. 4. *Passiflora salpoense* S. Leiva & Tantaléan. A. Muestra botánica depositada en el Herbario HAO con el número 20043 (Fotografías S. Leiva & M. Leiva 7032 HAO).



UPAO

Museo de Historia Natural y Cultural

HERBARIO ANTENOR ORREGO (HAO)

CONSTANCIA N° 26-2018-HAO-UPAO

El que suscribe, Director del Museo de Historia Natural y Cultural de la Universidad Privada Antenor Orrego, deja:

CONSTANCIA

Que **Milagros Joselyn Leiva Salinas**, estudiante de la carrera profesional de Medicina Humana de la Universidad Privada Antenor Orrego, ha solicitado la determinación de material vegetal, el cual corresponde a la siguiente especie:


***Passiflora salpoense* S. Leiva & Tantalean (Passifloraceae)**

El mismo que será utilizado para la tesis titulada: "Efecto ansiolítico *in vivo* del extracto etanólico de *Passiflora salpoense* (Passifloraceae)". La muestra ha sido signada con el código HAO n° 20043.

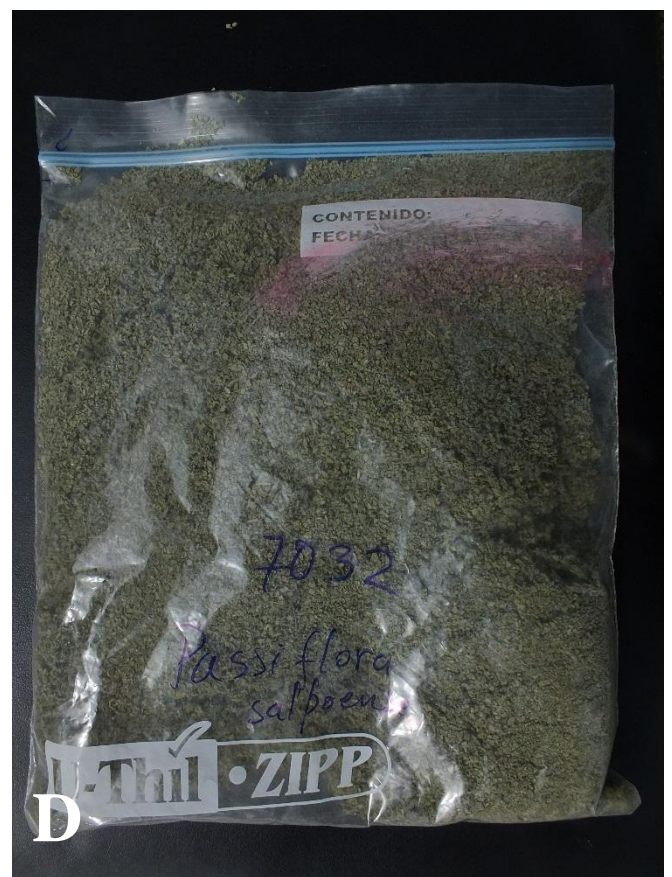
Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que correspondan.

Trujillo, 3 de julio de 2018




Mg. Segundo Leiva González
Director
Museo de Historia Natural y Cultural

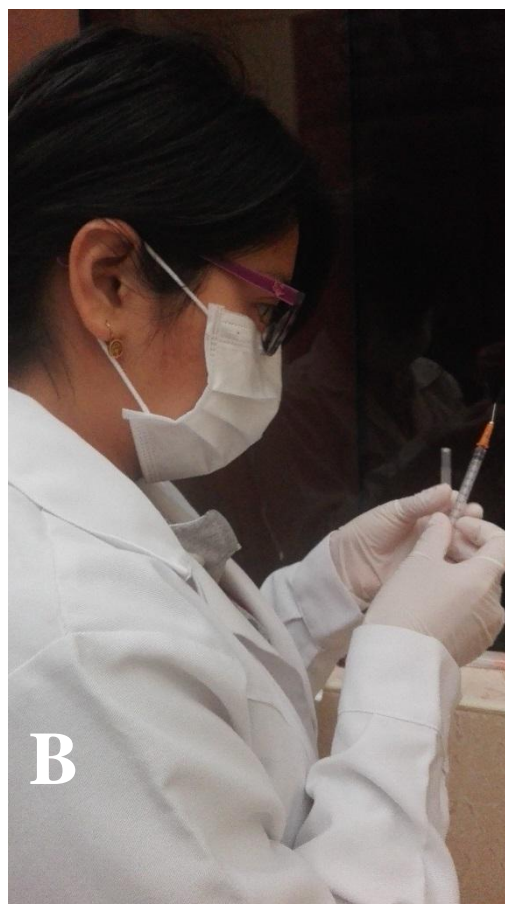
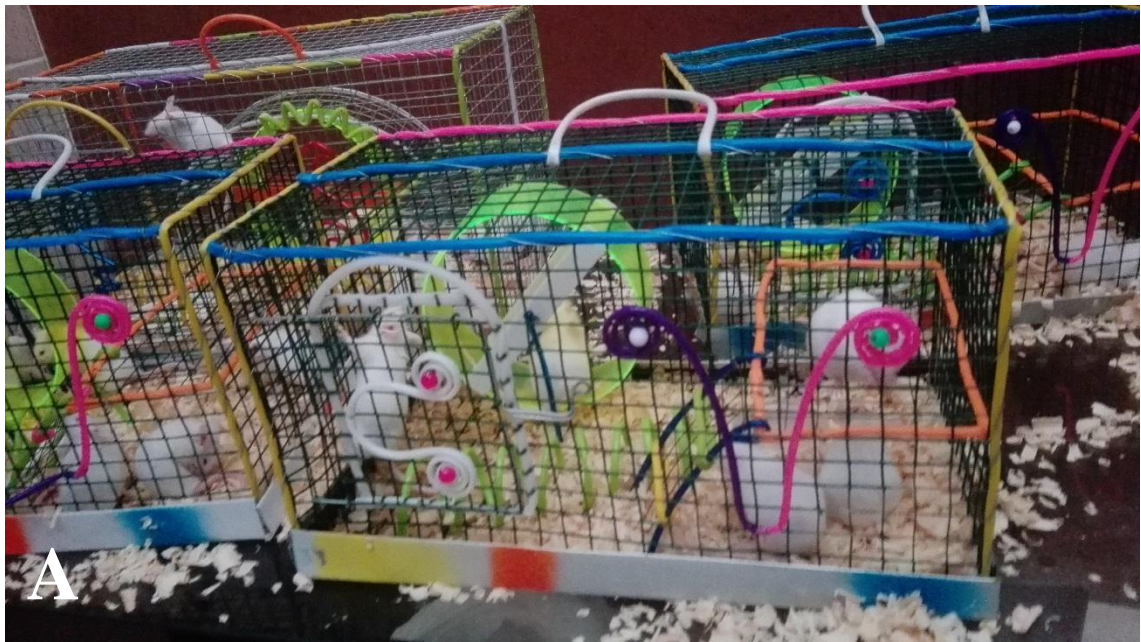
Anexo. 5. *Passiflora salpoense* S. Leiva & Tantaléan. Constancia del depósito de la muestra en el Herbario HAO (Fotografías S. Leiva & M. Leiva 5806 HAO).



Anexo. 6. *Passiflora salpoense* S. Leiva & Tantaléan. A-B. Muestra secando a temperatura ambiente sobre papel Kraft; C. Pulverizando muestra en molino mecánico; D. Muestra pulverizada en bolsa ziploc. (Fotografías S. Leiva & M. Leiva 7032 HAO).



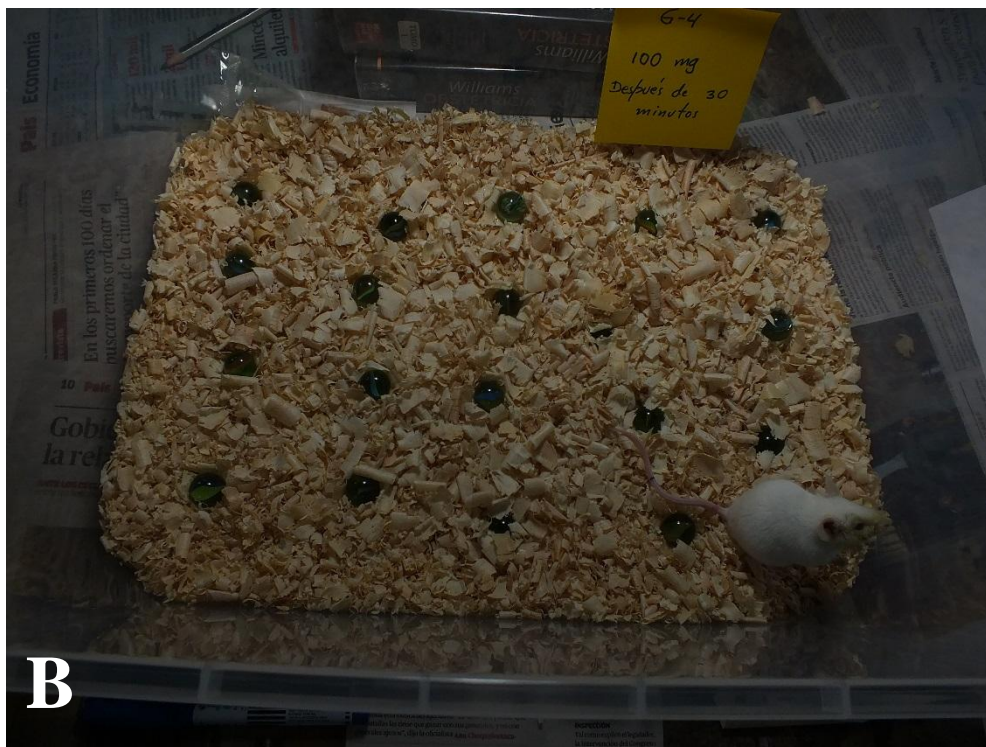
Anexo. 7. *Passiflora salpoense* S. Leiva & Tantaléan. A-E. Obtención de los metabolitos a través del extracto etanólico en el Laboratorio de Química II de la Universidad Nacional de Córdoba – Argentina; F. Dr. Juan Carlos Oberti director del laboratorio de Química. (Fotografías M. Leiva 7032).



Anexo. 8. A. Ratones Balb/c en el bioterio; B. Midiendo la dosis del tratamiento en jeringa de tuberculina. (Fotografías S. Leiva).



Anexo. 9. A. Inicio de la prueba de Murble buryin; B. Ratón sin administración del extracto etanólico; C. Ratón después de 30 minutos de la prueba. (Fotografías M. Leiva).



Anexo. 10. A. Ratón después de 30 minutos de haberle suministrado el extracto etanólico a dosis de 50 mg; B. Ratón después de 30 minutos de haberle suministrado el extracto etanólico a dosis de 100 mg (Fotografías M. Leiva).