

Determinación de la actividad ansiolítica del extracto hidroalcohólico de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*)

Determination of the anxiolytic activity of the hydroalcoholic extract of guava leaves (*Psidium guajava*)

Sebastián Patricio Pachacama Huilca ¹[0000-0003-0883-6497] Daniela Margoth Caichug Rivera ²[0000-0002-9755-1508]

¹Hospital General Pablo Arturo Suárez, Quito 170103, Ecuador.

²CEDECOR (Centro de Estudio de Compuestos Orgánicos), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Calle 115 y 47, (1900), La Plata, Argentina

¹sebastianpachacama92@gmail.com ²danyrivera2010@live.com

CITA EN APA:

Pachacama Huilca, S. P., & Caichug Rivera, D. M. (2022). Determination of the anxiolytic activity of the hydroalcoholic extract of guava leaves (*Psidium guajava*). *Tesla Revista Científica*, 3(1).
<https://doi.org/10.55204/trc.v3i1.e111>

Recibido: 20 de nov 2022

Revisado: 25 nov -19 Dic 2022

Corregido: 26 de diciembre 2022

Aceptado: 03 de enero 2023

Publicado: 03 de enero 2023

TESLA

Revista Científica
ISSN: 2796-9320



Los contenidos de este artículo están bajo una licencia de Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

Los autores conservan los derechos morales y patrimoniales de sus obras.

Resumen. El objetivo fue determinar la actividad ansiolítica del extracto hidroalcohólico de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*) en ratones (*Mus musculus*). La materia vegetal fue recolectada, secada, triturada y macerada con etanol al 70% durante tres días para su concentración. Se realizó el control de calidad de la droga seca y del extracto concentrado, para posteriormente ejecutar el tamizaje fitoquímico e identificar los metabolitos secundarios presentes en la planta. A continuación, el extracto se concentró hasta dejarlo seco y libre de alcohol. Para evaluar la actividad ansiolítica, se utilizaron 30 ratones machos con un peso de 25 - 30 g y una edad de 2 - 3 meses. Se utilizó propilenglicol al 15% como control negativo, Clonazepam como control positivo y los extractos a concentraciones de 25, 100, 200 y 300 mg/Kg. Se realizaron pruebas no condicionadas, con los equipos de: Cuarto Claro-Oscuro, Laberinto en Cruz Elevado y Campo Abierto. El comportamiento de los ratones en los distintos equipos fue grabado para posteriormente procesarlos en los programas ITOPI (Cuarto Claro-Oscuro y Laberinto en Cruz Elevado) y EMIS (Campo Abierto). Los datos fueron analizados en el programa IBM® SPSS® statistics versión 22, determinando que las dosis de 200 y 300 mg/Kg presentan mayor actividad ansiolítica sin afectar la locomoción de los biomodelos.

Palabras Clave: Actividad ansiolítica, hojas de guayaba (*psidium guajava*), campo abierto, cuarto claro oscuro, laberinto en cruz elevado.

Abstract: The objective was to determine the anxiolytic activity of the hydroalcoholic extract of guava leaves (*Psidium guajava*) in mice. The plant matter was collected, dried, crushed and macerated with 70% ethanol for three days for its concentration. The quality control of the dry drug and the concentrated extract was carried out, to later carry out the phytochemical screening and identify the secondary metabolites present in the plant. The extract was then concentrated until it was dry and free of alcohol. To evaluate the anxiolytic activity, 30 male mice weighing 25-30 g and aged 2-3 months were used. 15% propylene glycol was used as a negative control, Clonazepam as a positive control and the extracts at concentrations of 25, 100, 200 and 300 mg/Kg. Unconditional tests were carried out, with the teams of: Light-Dark Room, Labyrinth in Elevated Cross and Open Field. The behavior of the mice in the different equipment was recorded for later processing in the ITOPI (Light-Dark Room and Elevated Cross Maze) and EMIS (Open Field) programs. The data were analyzed in the IBM® SPSS® statistics program version 22, determining that the doses of 200 and 300 mg/Kg present greater anxiolytic activity without affecting the locomotion of the biomodels.

Keywords: anxiolytic activity, guava leaves (*psidium guajava*), open field, clear dark room, elevated cross maze.

INTRODUCCIÓN

La ansiedad es un trastorno mental que se caracteriza por producir varias sensaciones como preocupación y miedo, las cuales pueden interferir con las actividades diarias de la persona que lo padece. Existen factores que provocan desórdenes de ansiedad como: los biológicos hereditarios, el ambiente familiar, eventos traumáticos y estrés cotidiano; actualmente una de las poblaciones más afectadas son los jóvenes debido a las pocas fuentes de trabajo, el costo de vida, etc. (Vindel, 2011, pág. 74) (Villarroel, 2008, pág. 103).

Para tratar el desorden de ansiedad existen medicamentos conocidos como las benzodiacepinas, éstas poseen efectos indeseables que incluyen: somnolencia, amnesia, confusión y trastornos en la coordinación, con un considerable deterioro de las habilidades manuales. (MsC. Ana López Vantour, 2010, pág. 47) (Rubio, 2016, pág. 71). Uno de los tratamientos alternativos más utilizados a nivel mundial son las plantas medicinales, aplicados mayoritariamente en países en vías de desarrollo. Los principales argumentos a favor de las plantas medicinales son la existencia de un gran abanico de futuras medicinas por descubrir, el apoyo de la medicina oficial y preventiva. (Botanical.online, s.f.).

Las hojas contienen taninos, fenoles, flavonoides, triterpenos, esteroides, saponinas y compuestos aminados. Estudios realizados en ratones, mostraron que el pre-tratamiento con quercetina previene la respuesta de ansiedad al estrés experimental a través de la estabilización de los mastocitos, por lo que es altamente protector para el sistema nervioso (Juana Benedía, 2007, págs. 54-55) (Quercetina, s.f.).

Ansiedad

La prevalencia de los trastornos de ansiedad en todo el mundo varía de 2.5 a 7% por país. A nivel mundial, se estima que 284 millones de personas experimentaron un trastorno de ansiedad en 2017, lo que lo convierte en el trastorno de desarrollo mental o de salud mental más frecuente (OMS, 2019). Alrededor del 63% (179 millones) eran mujeres, frente a los 105 millones de hombres que lo padecen (Ritchie & Roser, 2018).

La ansiedad puede manifestarse en forma de crisis, miedo o peligros que puede llegar incluso a que la persona tenga pánico a ciertas horas del día. Este tipo de manifestaciones pueden darse tanto para niños como adultos sin depender del sexo, sin embargo, se conoce que esta patología afecta en especial a las mujeres a partir de la etapa reproductiva por la alteración hormonal que presenta (Sierra, Ortega, & Zubeidat, 2003, págs. 10 - 59).

Neurofisiopatología

Los patrones de comportamiento más típicos de la ansiedad se fundamentan en sustratos neuroanatómicos activados en respuesta a la detección predecible (miedo) e impredecible de sucesos (Lowery-Gionta, DiBerto, & Louis, 2018, págs. 1 - 13).

En una extensa revisión sobre la ansiedad, Davis et al. (2010) presentaron hallazgos en animales y humanos que describen una superposición de redes en la zona de la amígdala. La amígdala central y lateral han sido consideradas el "centro" del cerebro en cuanto al miedo, enviando señales que facilitan las respuestas defensivas automáticas y que estimulan conductas de congelamiento (Lowery-Gionta, DiBerto, & Louis, 2018, págs. 1 - 13)..

Tratamiento farmacológico de la ansiedad

En la actualidad existen tratamientos químicos que son utilizadas para contrarrestar esta patología, dentro de estos grupos farmacológicos podemos encontrar a dos familias:

- Benzodiazepinas
- Inhibidores selectivos de la recaptura de la serotonina

Benzodiazepinas:

Son medicamentos utilizados para tratar trastornos de ansiedad; principalmente actúan uniéndose a los receptores GABAérgicos y como consecuencia ocasionan una mayor afinidad del neurotransmisor al receptor, con ello se produce una apertura de los canales Cl, y favorecen las respuestas inhibitorias.

Tabla 1 Medicamentos más utilizados en el tratamiento para la ansiedad

Clonazepam	Tratamiento corto de 8 a 12 semanas
Alprazolam	Se administra de 2 a 3 veces al día.
Diazepam	

Fuente: (Nacional, 2016, págs. 1 - 15)

Inhibidores selectivos de la recaptura de la serotonina:

Este tipo de fármaco inhibe los transportadores de recaptación, por lo que la neurotransmisión sináptica aumenta y se prolonga. Cabe recordar que la neurotransmisión dopaminérgica se agota por vía de la 5-HT₂.

Tabla 2

Medicamentos de primera elección en el tratamiento para la ansiedad

Paroxetina	Si en el tratamiento no tiene mejorías se debe sustituir por Venlafaxina (evitar en pacientes con arritmias cardíacas) o Imipramina, se administra 1 vez al día
Sertralina	
Escitalopram	

Fuente: (Nacional, 2016, págs. 1 - 15)

Tratamiento no farmacológico

Plantas medicinales utilizadas para la ansiedad

La fitoterapia está diseñada para tranquilizar la salud, es decir, "calmar los nervios"; para esta propuesta, la administración oral de infusiones de plantas es común. En investigaciones realizadas en distintos países de América Latina se recopiló información sobre las plantas utilizadas para el tratamiento de los "nervios" para las cuales existen informes de actividad ansiolítica y / o antidepressiva (Gutiérrez, Chilpa, & Jaime, 2014, págs. 591 - 608).

En las investigaciones realizadas dentro de esta Institución Superior, las plantas que poseen actividad ansiolítica son hojas de toronjil (*Melissa officinalis*), flores de lavanda (*Lavandula officinalis*), Romerillo (*Hypericum laricifolium*), Pataconyuyo (*Peperomia peltiger* C. DC), hojas de Maracuyá y Badea (*Passiflora edulis* y *Passiflora quadrangularis*), hojas de Luquin rojo (planta) y taxo (*Passiflora manicata* y *Passiflora tripartita*), hojas y flores de Granadilla (*Passiflora ligularis* y *Passiflora mixta*) (Pachacama Huilca, 2020).

Psidium guajava

Tabla 3 Clasificación taxonómica de las hojas de guayaba

<p>Reino: <i>Plantae</i></p> <p>Orden: <i>Myrtales</i></p> <p>Familia: <i>Myrtaceae</i></p> <p>Subfamilia: <i>Myrtoideae</i></p> <p>Género: <i>Psidium</i></p> <p>Especie: <i>Guajava</i></p> <p>Nombre Científico: <i>Psidium guajava</i></p>	
---	--

Fuente: (Shruthi, AdhikariRoshan, & SajjekhanSunita, 2013, págs. 162 - 168).

P. guajava es un arbusto dicotiledóneo grande, de hoja perenne, generalmente de 3-10 m de altura con muchas ramas. Los tallos están torcidos y la corteza es de color marrón claro a rojizo, delgada, lisa y continuamente descamativa. El sistema de raíces es generalmente superficial y muy extenso, cada uno puede presentar raíces profundas. Las hojas son opuestas y simples; las estípulas están ausentes, pecíolo corto, 3-10 mm de largo; hoja oblonga a elíptica, venas prominentes, glándula punteada. (Shruthi, AdhikariRoshan, & SajjekhanSunita, 2013, págs. 162 - 168).

Composición química

Los resultados del análisis fitoquímico realizados por Akinjogunla mostraron que el extracto de la hoja de *P.guajava* tiene diferentes clases de componentes bioactivos como saponinas, alcaloides, taninos, glucósidos cardíacos, terpenos, flavonoides y esteroides, dichos resultados mostraron que las saponinas, los taninos y los alcaloides están presentes en altas concentraciones, seguidos de terpenos, flavonoides y esteroides, mientras que en pequeña concentración los glucósidos cardíacos (Akinjogunla, Etok, & Oshoma, 2011, págs. 329 - 336), (Shruthi, AdhikariRoshan, & SajjekhanSunita, 2013, págs. 162 - 168).

Usos comunes

Psidium guajava es utilizada para diferentes enfermedades como la anorexia, infecciones bacterianas, forúnculos, trastornos intestinales, bronquitis, catarro, cólera, resfriados, cólicos, convulsiones, tos, disentería, dispepsia, edema, epilepsia, fiebre, gingivitis, hemorroides, picazón, ictericia, náuseas, nefritis, problemas respiratorios, reumatismo, sarna, dolor de garganta, espasmos,

problemas neuronales, esguinces, problemas estomacales, hinchazón, tónico, dolor de muelas, úlceras y actúa como antiséptico, astringente y sedante (Shruthi, AdhikariRoshan, & SajjekhanSunita, 2013, págs. 162 - 168).

Modelos Experimentales (Pruebas condicionadas)

Tabla 4 Modelos de respuesta condicionada

<p>Los modelos experimentales o pruebas condicionadas son test en donde se somete a estímulos no cotidianos para determinar los efectos de la memoria, apetito, entre otras y generalmente son pruebas que requieren un entrenamiento exhaustivo y su ejecución debe ser prolongada</p> <p>(REJÓN-ORANTES, PERDOMO, & ROLDÁN, 2011, págs. 78 - 89).</p>	<p>Respuesta emocional condicionada</p> <hr/> <p>Supresión condicionada</p> <hr/> <p>Evitación pasiva/activa</p> <hr/> <p>Prueba de cuatro platos</p> <hr/> <p>Test de conflicto de Geller-Seifter y el de Vogel</p> <hr/> <p>Condicionamiento de vocalizaciones ultrasónicas</p> <hr/> <p>Estimulación eléctrica cerebral</p> <hr/> <p>Modelo de Thiébot de retirada de la señal de seguridad</p> <hr/> <p>Efecto del reforzamiento parcial sobre la extinción</p> <hr/> <p>Potenciación de la respuesta de sobresalto</p>
---	---

Fuente: (Polanco, Vargas-Irwin, & Góngora, 2011, págs. 141 - 148)

Modelos no Experimentales (Pruebas no condicionadas)

Tabla 5 Modelos de respuesta incondicionada

<p>Pruebas no condicionadas o no experimentales son aquellas que no requieren de un entrenamiento, por lo que son consideradas menos sensibles y las respuestas son espontáneas, por lo que permite conocer las conductas normales de los roedores</p> <p>(REJÓN-ORANTES, PERDOMO, & ROLDÁN, 2011, págs. 78 - 89).</p>	<p>Campo abierto</p> <hr/> <p>Tabla de agujeros</p> <hr/> <p>Caja de dos compartimientos blanco-negro</p> <hr/> <p>Laberinto elevado en cruz</p> <hr/> <p>Interacción social</p> <hr/> <p>Supresión de la ingesta inducida por la novedad</p> <hr/> <p>Contraste negativo</p> <hr/> <p>Conducta defensiva de enterramiento</p> <hr/> <p>Holeboard</p>
--	---

Fuente: (Polanco, Vargas-Irwin, & Góngora, 2011, págs. 141 - 148)

Entre las pruebas más conocidas para evaluar la actividad ansiolítica están:

Campo Claro Oscuro

El procedimiento experimental fue descrito por Crawley y Goodwin, la prueba se basa en la innata aversión de los roedores a las zonas bien iluminadas y en el comportamiento exploratorio espontáneo en respuesta a un ambiente de luz. La caja de prueba era de acrílico (46x27x30 cm) y se

encontraba dividida en dos compartimentos: el más pequeño era negro y el más grande era blanco e iluminado. Durante la sesión experimental, el ratón se coloca individualmente en el centro de la zona blanca frente a la apertura y se graba en video durante 5 minutos su comportamiento, se analizan parámetros como:

- El tiempo que pasa en el compartimento blanco,
- El número de transiciones entre los dos compartimentos (Pultrini, Galindo, & Costa, 2005, págs. 1720 – 1725).

Campo Abierto

La prueba de campo abierto permite evaluar el comportamiento exploratorio y la actividad general tanto en ratones como en ratas, donde se puede medir tanto la calidad como la cantidad de la actividad. El campo abierto es un recinto, generalmente de forma cuadrada, rectangular o circular con paredes circundantes que evitan el escape.

El resultado de interés más básico y común es el "movimiento"; sin embargo, esto puede estar influenciado por el rendimiento motor, el impulso exploratorio, el congelamiento u otro comportamiento relacionado con el miedo, la enfermedad, el ciclo circadiano, entre muchas otras variables.

Parámetros como la distancia recorrida, el tiempo dedicado a la mudanza, la cría y el cambio de actividad a lo largo del experimento son algunas de las medidas que se pueden tabular e informar; resultados como la defecación, el tiempo en el centro y la actividad dentro de los primeros 5 minutos, probablemente evalúen algunos aspectos de la emocionalidad, incluida la ansiedad. (Gould, Dao, & Kovacsics, 2009, págs. 1 - 20).

Laberinto en cruz elevado

Es una prueba ampliamente utilizada, se basa en la aversión natural de los roedores a las alturas y espacios abiertos, fue desarrollado originalmente por Pellow. El laberinto consiste en dos brazos abiertos y dos brazos cerrados elevados a 50 cm del piso, cada brazo tiene 30 cm de largo y 10 cm de ancho y los brazos cerrados tienen 15 cm de alto. Para empezar la prueba el ratón se coloca en el centro del laberinto frente a uno de los brazos abiertos.

Durante los siguientes 10 o 15 minutos, se registrarán el número de entradas en cada brazo y la cantidad de tiempo que pasó en cada brazo. Al final de cada prueba, se retira el ratón y se limpia el laberinto con alcohol al 15% (Peng, Wu, Chen, Chen, & Hsieh, 2005, págs. 2451 – 2462).

METODOLOGÍA O MATERIALES Y METODOS

La investigación se basó en la evaluación de la actividad ansiolítica del extracto de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*) en ratones (*Mus musculus*) a diversas concentraciones, las cuales fueron: 25 ppm, 100 ppm, 200 ppm y 300 ppm. Se utilizaron tres equipos de tipo exploratorio:

laberinto en cruz elevado, campo abierto y cuarto claro-oscuro y se realizó en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, específicamente en los laboratorios de Productos Naturales, Análisis Instrumental y Bioterio.

Identificación de la materia vegetal

La identificación de *Psidium guajava* se realizó mediante la recolección de la materia vegetal y las muestras fueron identificadas en el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Las muestras vegetales de *Psidium guajava* fueron recolectadas en la Región Costa, Provincia del Guayas, cantón Nobol.

Material biológico:

Para la determinación de la actividad ansiolítica se utilizaron ratones macho (*Mus musculus*) de 2 a 3 meses de edad y con un peso entre 25 a 30 g, los cuales fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) de la ciudad de Guayaquil. La alimentación suministrada durante el experimento fue ad libitum, considerando que no supere los 5 g en cada porción.

Tabla 6 Lista de materiales, equipos y reactivos utilizados durante la investigación.

SECADO Y TRITURADO DE LAS HOJAS DE <i>Psidium guajava</i>		
Materiales	Equipos	Reactivos
Espátula Papel aluminio	Molino Arthur Thomas C.O Estufa Memmert SNB400	
CONTROL DE CALIDAD DE LA MATERIA VEGETAL		
Materiales	Equipos	Reactivos
Cápsula Crisol de porcelana Embudo Espátula Papel filtro Pinzas para cápsulas Pipeta graduada Reverbero Trípode Vaso de precipitación Vidrio reloj	Balanza analítica Desecador Estufa Memmert SNB400 Mufla IVYMEN N-8LITROS 1100°C Sonicador	Agua destilada Ácido clorhídrico al 10% Nitrato de plata 0.1 M
TAMIZAJE FITOQUÍMICO		
Materiales	Equipos	Reactivos
Capilar Embudo Espátula Frasco ámbar Gradilla Papel aluminio Papel filtro Pera de succión Pinza para tubos Pipetas graduadas de 1 mL, 5 mL y 10 mL Probeta de 100 mL Reverbero Trípode Tubos de ensayo Vasos de precipitación de 250 mL y	Sorbona Cámara UV Chromato-VUE	Agua destilada Alcohol amílico Ácido clorhídrico al 1% Ácido clorhídrico concentrado Ácido sulfúrico concentrado Anhídrido sulfúrico concentrado Carbonato de sodio Cinta de magnesio metálico Cloruro de sodio Cloruro férrico Cloroformo Etanol Éter etílico Hidróxido de sodio al 5% Reactivo de Baljet

1000 mL		Reactivo de Borntrager Reactivo de Catequinas Reactivo de Dragendorff Reactivo de FeCl ₃ Reactivo de Fehling A y B Reactivo de Mayer Reactivo de Sudan III Reactivo de Wagner
CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO		
Materiales	Equipos	Reactivos
Cápsulas de porcelana Picnómetro de 10 mL Pinzas para cápsulas Pizeta Probeta 100 mL Reverbero Vasos de precipitación	Estufa Memmert SNB400 pH-metro Refractómetro	Agua destilada Etanol 98%
OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CONCENTRADO		
Materiales	Equipos	Reactivos
Balón esmerilado 250 mL Espátula Mangueras	Bomba de presión al vacío Congelador Rota vapor BUCHI Sonicador	Agua destilada
CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES Y FLAVONOIDES		
Materiales	Equipos	Reactivos
Balones de aforo Cronómetro Gradilla Micropipetas Papel aluminio Pera de succión Pipetas Puntas amarillas Tubos de ensayo Vasos de precipitación	Balanza analítica Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolución 220 Vórtex mixer MRC S1-100	Agua destilada Ácido gálico Carbonato de sodio al 7.5% Cloruro de aluminio al 10% Etanol Hidróxido de potasio 1 M Nitrito de sodio al 5% Reactivo de Folin-Ciocalteu Quercetina
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA		
Materiales	Equipos	Reactivos
Bebedores Cajas de plástico Cánula pequeña Frascos ámbar de 50 mL Jeringuilla de 1mL Rejillas	Balanza analítica Cámara D-LINK Computador	Clonazepam 2.5 mg/mL Extracto 25, 100, 200 y 300 mg/mL Propilenglicol Vaselina

Métodos y técnicas

Recolección, lavado y secado de la materia vegetal

Se recolectaron las hojas de guayaba (*Psidium guajava*) considerando las de mejor estado para posteriormente limpiarlas y secarlas en la estufa a una temperatura de 40°C. A continuación, se procedió a la molienda del material vegetal utilizando el molino Arthur Thomas C.O. El material molido fue almacenado en fundas ziploc para protegerlas de la humedad y poderlas conservar por más tiempo.

Parámetros de control de calidad a la planta seca

Determinación de humedad

Se pesó aproximadamente 3 g de la planta seca y triturada y se ubicó en una cápsula de porcelana previamente tarada. Posteriormente se colocó en la estufa por 3 horas a una temperatura de 105°C. Se puso en el desecador y finalmente se pesó.

Expresión:

$$\%H = \frac{m2 - m1}{m2 - m} \times 100$$

Donde:

%H= Porcentaje de humedad

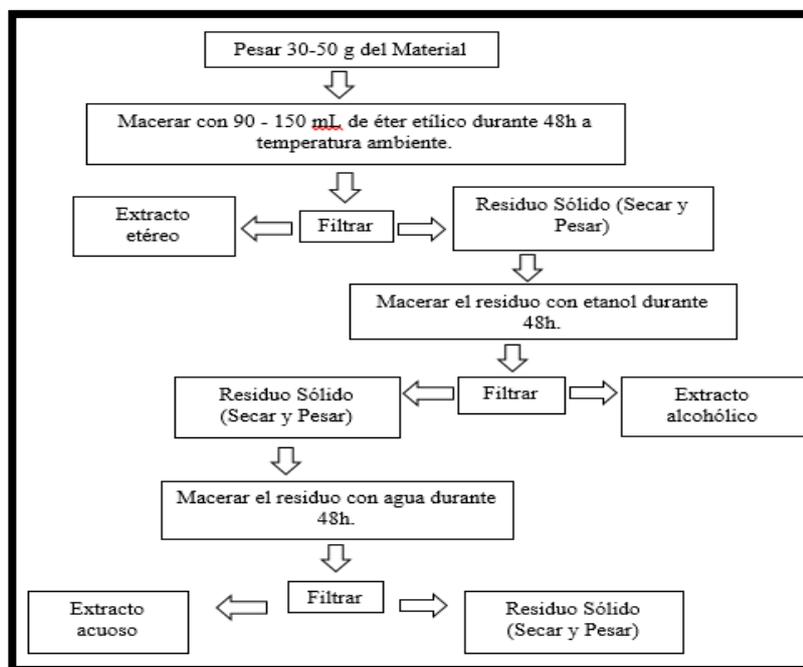
m2= peso cápsula con la muestra vegetal (g)

m1= peso de la cápsula con la muestra vegetal desecada (g)

m= peso de la cápsula vacía (g)

Tamizaje o screening fitoquímico

Figura 1 Esquema para el Tamizaje Fitoquímico.



Fuente: Miranda M., 2006

El tamizaje o screening fitoquímico es una técnica que se utiliza para extraer los metabolitos secundarios de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reactivos que nos brinden reacciones de coloración y precipitación. Esta es una de las primeras etapas para la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos que se encuentran en la planta estudiada (UNID, 2016).

Preparación del extracto hidroalcohólico de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*)

Para preparar el extracto hidroalcohólico, se comenzó pesando 50 g de la droga vegetal de *Psidium guajava* para posteriormente colocarlo en un frasco ámbar el cual contenía 500 mL de etanol al 70% y se lo dejó macerar. Después de la maceración por 3 días se colocó el frasco en el

sonicador por un lapso de 15 minutos y a continuación se filtró. Finalmente, se concentró en el rotavapor para la evaporación del alcohol.

Actividad ansiolítica

Para la determinación de la actividad ansiolítica se empleó ratones macho de la especie *Mus musculus*, los cuales poseían características especiales como edad entre 2 a 3 meses aproximadamente y un peso de 25 a 30 g, de manera que si no se encontraban en este rango de peso se les proporcionaba una dieta hasta lograr alcanzar el peso requerido. Los biomodelos fueron adquiridos en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública “Dr. Leopoldo Pérez” (INSPI), ubicado en la ciudad de Guayaquil.

Las condiciones macro-ambientales que se brindó a los ratones antes y durante la experimentación fueron: temperatura de 21 a 23°C, iluminación controlada (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad), ventilación y ambiente libre de ruidos que provengan del exterior del Bioterio. Los biomodelos fueron pesados, agrupados y colocados en diferentes cajas plásticas las cuales contaban con sus respectivas rejillas, tamo esterilizado, bebedero con agua clorada y comida balanceada.

Equipo electrónico de medición Cuarto Claro-Oscuro

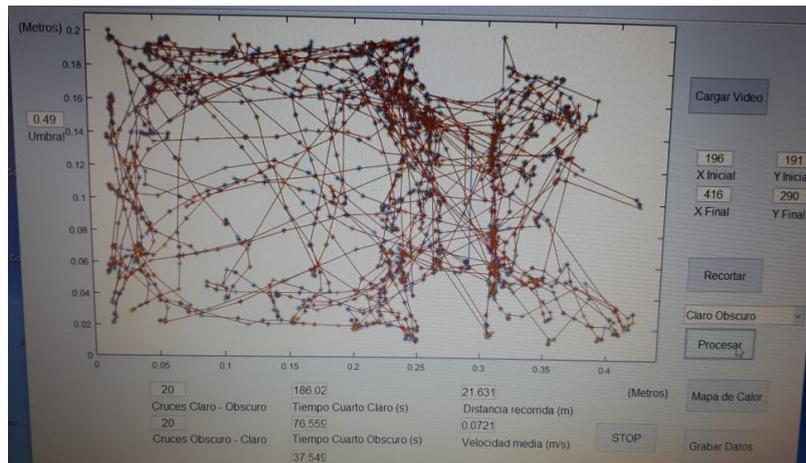
Este equipo de medición consiste en una caja acrílica compuesta de dos partes, una parte clara que posee una dimensión de 29 x 21 cm y la parte oscura con una dimensión de 15 x 21 cm; las dos partes poseen una altura de 21 cm. Posee una pared acrílica de color negro que separa la parte clara de la oscura y esta tiene una abertura (15 x 3 cm) que permite el paso del biomodelo de un lado a otro (David Moreno, 2018, p. 32).

La caja acrílica se encuentra dentro de una estructura metálica que está recubierta por una cortina de color café la cual cumple la función de impedir el paso de luz hacia la caja. En el techo de la estructura se encuentra una cámara D-link la cual permitió grabar en video todos los movimientos del ratón en la caja. Los videos del equipo cuarto claro-oscuro fueron procesados en el software ITOPI el cual brinda los resultados que sirven para realizar el análisis estadístico.

Tabla 7 Criterios de medición en el Cuarto claro-oscuro

Número de entradas del cuarto claro al oscuro	Mayor número de entradas = mejor locomoción.
Número de entradas del cuarto oscuro al claro	Mayor número de entradas = mejor locomoción.
Tiempo de estancia en el cuarto claro (s)	El ratón se encuentra relajado y explora lugares iluminados.
Tiempo de estancia en el cuarto oscuro (s)	El ratón esta estresado y permanece en lugares sin luz.
Distancia recorrida (m)	Mayor trayectoria = mejor actividad locomotora.
Velocidad media (m/s)	Mayor desplazamiento = mejor actividad locomotora.

Figura 5 Programa ITOPI del “Cuarto claro-oscuro”



Equipo electrónico de medición Laberinto en Cruz Elevado

Este equipo de medición se trata de una estructura acrílica de color negro que consta de cuatro brazos; dos brazos denominados abiertos que cuentan con una dimensión de 30 x 10 cm y dos brazos cerrados de igual dimensión de 30 x 10 cm, pero además esta parte posee paredes de 20 cm de altura. Esta estructura acrílica está conectada a un soporte de 38 cm a nivel del suelo (David Moreno, 2018, p. 30).

El Laberinto Cruz-Elevado se encuentra dentro de una estructura metálica que está recubierta por una cortina de color café la cual cumple la función de impedir el paso de luz hacia el laberinto. En el techo de la estructura se encuentra una cámara D-link la cual permite grabar en video todos los movimientos del ratón en el equipo. Los videos del equipo Laberinto en Cruz Elevado fueron procesados en el software ITOPI el cual brinda los resultados que se emplean para realizar el análisis estadístico.

Figura 6 Programa ITOPI del “Laberinto en Cruz Elevado”

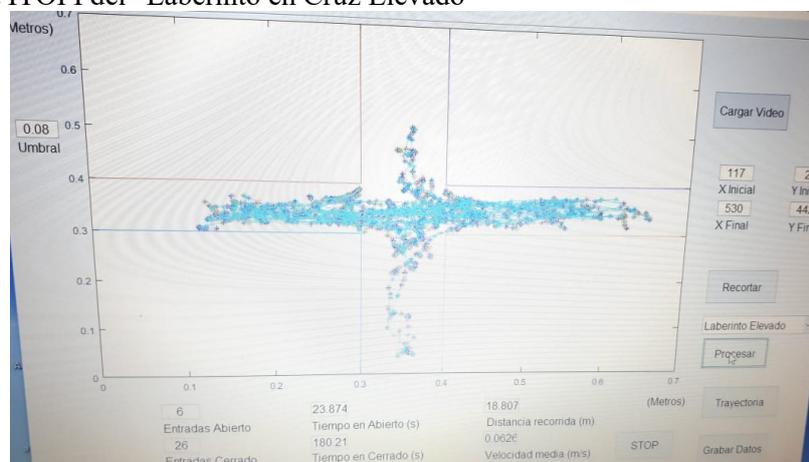


Tabla 8 Criterios de medición en el Laberinto en Cruz Elevado

Número de entradas brazos abiertos	Mayor número de entradas = mejor locomoción.
Número de entradas brazos cerrados	Mayor número de entradas = mejor locomoción.
Número de entradas a la mitad	Mayor número de entradas = mejor locomoción.
Tiempo de permanencia en los	Una mayor estadía en esta zona significa que el ratón se encuentra relajado

brazos abiertos	
Tiempo de permanencia en los brazos cerrado	Una mayor estadía en esta zona significa que el ratón se encuentra estresado.
Tiempo de permanencia en el centro	El ratón quiere examinar otras zonas.
Distancia recorrida	Mayor trayectoria = mejor actividad locomotora.
Velocidad media	Mayor desplazamiento = mejor actividad locomotora.

Equipo electrónico de medición Campo Abierto

Este equipo de medición se trata de una caja acrílica de forma cuadrada, cuyas dimensiones son de 68 x 68 cm y sus paredes tienen una altura de 45 cm (GODOY, 2018, p. 49). La caja acrílica se encuentra dentro de una estructura metálica que está recubierta por una cortina de color café la cual cumple la función de impedir el paso de luz hacia la caja.

En el techo de la estructura se encuentra una cámara D-link la cual permite grabar en video todos los movimientos del ratón. Los videos del equipo Campo abierto fueron procesados en el software EMIS el cual brinda los resultados que se emplean para realizar el análisis estadístico.

Figura 7 Equipo de medición “Campo abierto”

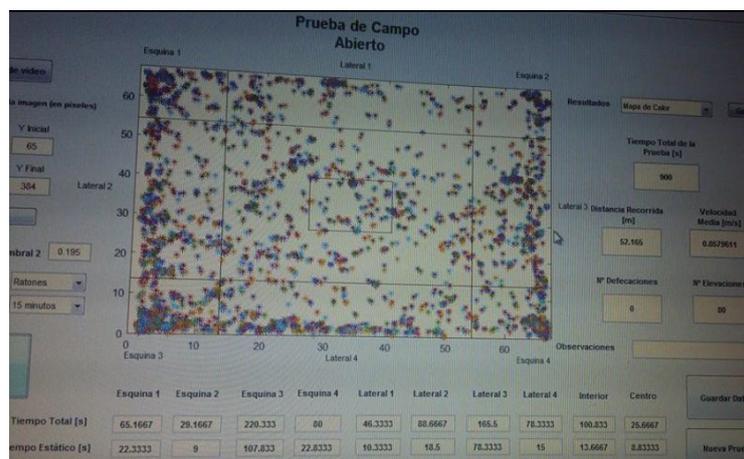


Tabla 9 Criterios de medición en el Campo Abierto

Distancia recorrida	Mayor trayectoria = actividad locomotora no alterada.
Velocidad media	Mayor desplazamiento = buena actividad locomotora.
Número de defecaciones	Más defecaciones = roedor estresado.
Número de elevaciones	Más elevaciones = roedor estresado.
Tiempo en esquinas	Mayor tiempo en las esquinas = roedor estresado.
Tiempo en laterales	Mayor tiempo en los laterales = roedor estresado.
Tiempo en el interior	Mayor tiempo en el interior = roedor relajado y busca lugares con luz por el centro.
Tiempo en el centro	Mayor tiempo en el centro = roedor relajado y busca nuevos ambientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados de control de calidad de las hojas de guayaba (Psidium guajava)

Tabla 10 Resultados control de calidad hojas de guayaba (Psidium guajava)

PARÁMETRO	Hojas de Guayaba	Límites de referencia	Normativa
Humedad (%)	4,77±0,008	Hasta 14%	USP# 35
Cenizas totales (%)	8,51±0,01	Hasta 12%	USP# 35
Cenizas solubles en agua (%)	2,27±0,03	Hasta 7%	USP# 35
Cenizas insolubles en HCl (%)	1,88±0,02	Hasta 5%	USP# 35

Resultados del Tamizaje Fitoquímico**Tabla 11** Resultados del Tamizaje fitoquímico de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*)

TIPO DE ENSAYO	COMPUESTO IDENTIFICADO	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Sudán	Grasas	+	N/A	N/A
Baljet	Lactonas y cumarinas	++	++	N/A
Dragendorff	Alcaloides	+++	++	++
Mayer	Alcaloides	+	+	+
Wagner	Alcaloides	+++	+++	+++
Libermann bouchard	Triterpenos y esteroides	+	+	N/A
Catequinas	Catequinas	N/A	+	N/A
Resinas	Resinas	N/A	-	N/A
Fehling	Azúcares	N/A	++	++
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	N/A	+++	++
Espuma	Saponinas	N/A	-	-
Borntrager	Quinonas	N/A	+++	N/A
Shinoda	Flavonoides	N/A	++	+++
Antocianidinas	Secuencias de grupos de flavonoides	N/A	++	N/A
Mucílagos	Polisacáridos	N/A	N/A	+
Principios amargos y astringentes		N/A	N/A	Amargo

N/A= no aplica, + = presencia, - = ausencia

Equipo electrónico de medición “Campo Claro-Oscuro”**Tabla 12:** Test ANOVA para el Tiempo Cuarto Claro y Tiempo Cuarto Oscuro

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
TIEMPO_CUARTO CLARO	Inter-grupos	29,678	5	5,936	28,459	,000
	Intra-grupos	5,006	24	,209		
	Total	34,683	29			
TIEMPO_CUARTO OSCURO	Inter-grupos	36,256	5	7,251	25,186	,000
	Intra-grupos	6,910	24	,288		
	Total	43,166	29			

Tabla 13 Test TUKEY para el Tiempo Cuarto Claro y Tiempo Cuarto Oscuro

TIEMPO_CUARTO_CLARO				
HSD de Tukey ^a				
tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Control -	5	1,1280		
dosis2	5		2,1100	
dosis1	5		2,4720	
dosis3	5			3,5000
dosis4	5			3,7840
control	5			3,8480
Sig.		1,000	,806	,830

En la Tabla 13 se observa en el tiempo del cuarto claro la conformación de 3 subgrupos homogéneos: el primero con el control negativo, en el segundo la dosis 1 y dosis 2, y el último grupo

formado por el control positivo, la dosis 3 y dosis 4; este último indica que los resultados entre ellos son estadísticamente similares, es decir, permanecieron más tiempo en el cuarto claro, lo que indica que el efecto de la Dosis 3 y 4 es parecido al efecto del medicamento.

En el cuarto oscuro se visualiza la formación de dos subgrupos homogéneos, donde el control negativo junto con la dosis 1 permanece mayor tiempo en la zona oscura, en este caso este parámetro es indicativo del estrés que está experimentando el animal. Por lo que estadísticamente los efectos de las dosis 3, dosis 4 y control positivo presentan similar actividad ansiolítica según el tiempo de permanencia de los animales en la zona clara

Número de cruces Cuarto Claro-Oscuro, Distancia recorrida y Velocidad media

Tabla 14 Resultados de número de cruces del cuarto claro-oscuro, distancia recorrida y velocidad media

Grupos	Número de cruces Claro-Oscuro	Distancia recorrida	Velocidad media
Control -	19	21,5	0,1
Control +	7,6	11,4	0,0
D1-PG	12,6	18,7	0,1
D2-PG	15,8	19,4	0,1
D3-PG	15,4	21,1	0,1
D4-PG	12	21,0	0,1

En la Tabla 14 el medicamento usado en el control positivo es Clonazepam, compuesto usado por sus importantes efectos ansiolíticos, sin embargo su principal problema es que inhibe la locomoción; el control negativo, al ser sometido a la administración de propilenglicol se pudo observar un mayor número de cruces a diferencia del control positivo, este parámetro ayuda a identificar si los tratamientos administrados ocasionan alguna alteración en la locomoción del sujeto experimental, de ser así, sería un importante efecto adverso, por lo que las personas no podrían realizar actividades como caminar, manejar o manipular maquinaria pesada.

Tabla 15 Test ANOVA para cruces en el cuarto claro-oscuro, distancia recorrida y velocidad media

ANOVA

		Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
NÚMERO_CRUCES	Inter-grupos	383,467	5	76,693	6,858	,000
	Intra-grupos	268,400	24	11,183		
	Total	651,867	29			
VELOCIDAD_MEDIA	Inter-grupos	,005	5	,001	7,647	,000
	Intra-grupos	,003	24	,000		
	Total	,008	29			
DISTANCIA_RECORRIDA	Inter-grupos	359,867	5	71,973	7,305	,000
	Intra-grupos	236,448	24	9,852		
	Total	596,315	29			

En la Tabla 15 se observa los resultados para el test de ANOVA de la distancia recorrida, velocidad media y el número de cruces que realizó el ratón en este equipo, como el valor de la significancia es menor a 0.001, prueba que las medias presentan diferencias; para saber cuáles medias son diferentes se procedió a realizar el test de TUKEY.

CONCLUSIONES

Previo a la comprobación de la actividad ansiolítica de la especie vegetal se realizaron las pruebas de control de calidad de la droga cruda y del extracto hidroalcohólico de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*) cumpliendo todos los parámetros establecidos en la USP 35, haciéndola segura para las pruebas posteriores. Se identificaron cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en las hojas de guayaba (*Psidium guajava*) como: alcaloides, azúcares, compuestos fenólicos, lactonas, quinonas y flavonoides. Posiblemente los compuestos fenólicos y alcaloides contribuyen a la actividad biológica de la planta.

Se determinó la cantidad de flavonoides y fenoles totales presentes en el extracto de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*), obteniendo 86,32 mg Equivalentes de Quercetina/g de extracto seco para flavonoides totales y 304,67 mg Equivalentes de ácido Gálico/g de extracto seco para fenoles totales. Comparando los resultados que se obtuvieron en otras plantas previamente estudiadas como *Lavandula officinalis*, *Melissa officinalis*, *Hypericum laricifolium* y *Peperomia peltigera*, es un valor alto de flavonoides y fenoles totales, pero un valor bajo a comparación de *Passiflora manicata* y *Passiflora tripartita* que contienen 661,68 mg Equivalentes de Quercetina/g y 157,53 mg Equivalentes de Quercetina/g, respectivamente.

Se determinó que las dosis con mayor efectividad fueron las de 200 mg/kg y 300 mg/kg, lo cual se comprobó estadísticamente debido a que presentaban valores similares a los obtenidos con el control positivo en parámetros que señalan menor nivel de estrés y mayor actitud exploratoria. Además, se observó que la locomoción del roedor no fue afectada debido a que no formó ningún grupo con el control positivo en parámetros como distancia recorrida, velocidad media y elevaciones considerándose una gran ventaja frente a los fármacos tradicionales usados para la ansiedad.

FINANCIACIÓN

Los autores no recibieron financiación para el desarrollo de la presente investigación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los Autores declaran que no existe conflicto de intereses

CONTRIBUCIÓN DE AUTORÍA

En concordancia con la taxonomía establecida internacionalmente para la asignación de créditos a autores de artículos científicos (<https://credit.niso.org/>). Los autores declaran sus contribuciones en la siguiente matriz:

Participar activamente en:	Pachacama Huilca S.	Cachug Rivera D.
Conceptualización	X	
Análisis formal		X
Adquisición de fondos		X
Investigación	X	
Metodología	X	

Administración del proyecto	X	X
Recursos	X	
Redacción –borrador original	X	
Redacción –revisión y edición	X	X
La discusión de los resultados	X	
Revisión y aprobación de la versión final del trabajo.	X	X

RECONOCIMIENTO A REVISORES:

La revista reconoce el tiempo y esfuerzo del editor / editor de sección PhD. Diego Colasurdo, y de revisores anónimos que dedicaron su tiempo y esfuerzo en la evaluación y mejoramiento del presente artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- Akinjogunla, Etok, & Oshoma. (2011). Preliminary phytochemistry and in-vitroantibacterial efficacy of Hydro-Ethanollic leaf extracts of Psidium guajava on common urinary tract Bacterial Pathogen. *Bioresearch Bulletin*, 5, 329 - 336.
- Botanical.online*. (s.f.). Recuperado el 24 de Julio de 2018, de Importancia de las plantas: <https://www.botanical-online.com/plantasmedicinalesimportancia.htm>
- David Moreno, J. J. (Mayo de 2018). Implementación de sistemas evaluadores de conducta ansiolítica en ratones de laboratorio utilizando procesamiento digital de imágenes. *MASKAY*, 8(1), 27-34.
- Godoy, M. (2018). “DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DE *Hypericum laricifolium* (ROMERILLO) EN RATONES (*Mus musculus*)”. 129. Riobamba, Ecuador.
- Gutiérrez, L. G., Chilpa, R. R., & Jaime, H. B. (2014). Medicinal plants for the treatment of “nervios”, anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine. *Brasileira de Farmacognosia*, 24(5), 591 - 608.
- Juana Benedía, Á. G. (Enero de 2007). Ansiedad. *ELSEVIER*, 21(01). Recuperado el 12 de Agosto de 2018
- Lowery-Gionta, Emily G; DiBerto, Jeffrey; Mazzone, Christopher M & Kash, Thomas Louis. (2018). GABA neurons of the ventral periaqueductal gray area modulate behaviors associated with anxiety and conditioned fear. *Brain Structure and Function*, 1, 1 - 13.
- MsC. Ana López Vantour, M. A. (11 de Enero de 2010). *BVS Cuba*. Recuperado el 24 de Julio de 2018, de Uso y abuso de las benzodiazepinas: http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol_14_4_10/san17410.htm
- Nacional, C. d. (2016). Diagnostico y Tratamiento de los Trastornos de la Ansiedad en Adulto . *Guia de Práctica Clínica - Mexico*, 1, 1 - 15.
- OMS. (2019). *Organizacion Mundial de la Salud*. Recuperado el 08 de noviembre de 2019, de https://www.who.int/mental_health/management/es/
- Pachacama Huilca, S. P. (2020). Determinación de la actividad ansiolítica del extracto hidroalcohólico de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*) en ratones (*Mus musculus*).

- Peng, W.-H., Wu, C.-R., Chen, C.-S., Chen, C.-F., & Hsieh, Z.-C. L.-T. (2005). Anxiolytic effect of berberine on exploratory activity of the mouse in two experimental anxiety models: Interaction with drugs acting at 5-HT receptors. *Life Sciences*, 75, 2451 – 2462.
- Polanco, L. A., Vargas-Irwin, C., & Góngora, M. E. (2011). Animal models: A review from three tests used in anxiety. *Suma Psicológica*, 18(2), 141 - 148.
- Pultrini, A. d., Galindo, L. A., & Costa, M. (2005). Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sciences*, 78, 1720 – 1725.
- Quercetina. (s.f.). *La quercetina: una estrella en ascenso de Nervios, Inmunidad y Metabolismo*. Recuperado el 12 de Agosto de 2018, de <http://conocimiento.articulosask.com/2health/2naturalhealth/1002209891.html>
- Rejón-Orantes, J. D., Perdomo, D. P., & Roldán, G. (2011). Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas. *Redalyc*, 52(1), 78 - 89.
- Ritchie, H., & Roser, M. (2018). *Mental Health*. Recuperado el 08 de noviembre de 2019, de <https://ourworldindata.org/mental-health>
- Rubio, T. V. (Mayo de 2016). *Universidad de Jaén*. Recuperado el 24 de Julio de 2018, de Descripción de terapias alternativas para los trastornos de ansiedad.
- Shruthi, S. D., AdhikariRoshan, & SajjekhanSunita, S. S. (2013). A REVIEW ON THE MEDICINAL PLANT PSIDIUM GUAJAVALLIN. (MYRTACEAE). *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 3, 162 -168.
- Sierra, J. C., Ortega, V., & Zubeidat, I. (2003). Ansiedad, angustia y estrés: tres conceptos a diferenciar. *REVISTA MAL-ESTAR E SUBJETIVIDADE / FORTALEZA*, III(1), 10 - 59.
- UNID. (2016). Tamizaje o screening fitoquímico. Lima.
- Villarroel, B. (2008). *Clínica de la Ansiedad*. Recuperado el 24 de Julio de 2018, de Psicólogos especialistas en el tratamiento de la ansiedad: <https://clinicadeansiedad.com/problemas/introduccion/causas-de-la-ansiedad-origen-y-mantenimiento/>
- Vindel, C. (24 de Diciembre de 2011). *Sociedad Española para el Estudio de la Ansiedad y el Estrés*. Recuperado el 24 de 07 de 2018, de Salud: <http://www.ansiedadystres.org/salud>