

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



**ESCUELA DE MEDICINA HUMANA**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO CIRUJANO

“ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS  
HOJAS DE THYMUS VULGARIS (TOMILLO) EN RATTUS  
NOVERGICUS”

**AUTOR:**

SERGIO ADRIÁN, MORALES VERGARA

**ASESOR:**

Mg. LUÍS FERNÁNDEZ SOSAYA

Trujillo – Perú

2018



**UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO**

**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA**

**ESCUELA DE MEDICINA HUMANA**

**“Actividad ansiolítica del extracto etanólico de las hojas de  
Thymus vulgaris (Tomillo) en Rattus norvegicus”**

**MIEMBROS DEL JURADO:**

---

**Dra. OFELIA CORDOVA PAZ SOLDAN**

**PRESIDENTE**

---

**Dra. PAOLA RODRIGUEZ GARCIA**

**SECRETARIA**

---

**Dra. ELENA CACERES ANDONAIRE**

**VOCAL**

## DEDICATORIA

**A Dios**, por darme vida, salud, pasión y fuerza de voluntad para lograr lo que realmente quiero.

**A mis padres**, por brindarme por su apoyo incondicional tanto como padres como amigos e inculcarme correctamente los principios y valores necesarios para salir adelante en esta sociedad.

**A mis hermanos**, por confiar en mí, ser una motivación a seguir y por estar a mi lado cuando más los necesito.

**A mis abuelos**, por darme todo su cariño, por compartir conmigo todas sus experiencias y mostrarme que el amor para toda la vida sí existe.

## AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, **Dr. Luis Fernández Sosaya**, por el tiempo brindado, su apoyo y su disposición a guiarme en la realización de esta investigación.

Al **Dr. Julio Campos Florián**, por su apoyo permanente al facilitar y orientar en el uso de equipos para el presente trabajo.

Al **Dr. José Caballero Alvarado**, quien en todo momento estuvo dispuesto a absolver mis dudas de una manera eficaz, sencilla y eficiente.

Al **Dr. Loric Loyola Mendoza**, por brindarme una orientación clara y didáctica en el área Químico-Farmacéutica

A **mis amigos** que me apoyaron en este proyecto.

Al **Centro de Atención de Medicina Complementaria** y la **Universidad Nacional de Trujillo**, lugares que me abrieron sus puertas para llevar a cabo el presente estudio.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Justificación.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Formulación del Problema Científico.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Hipótesis .....</b>	<b>15</b>
<b>1.4 Objetivos.....</b>	<b>15</b>
<b>II. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Población, Muestra y Muestreo .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Diseño de Estudio.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Variables, Definición Operacional y Escala de Medición.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Procedimientos.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5 Análisis e Interpretación de la Información.....</b>	<b>29</b>
<b>2.6 Aspectos éticos.....</b>	<b>30</b>
<b>III.RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>IV.DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>43</b>
<b>VIII.ANEXOS.....</b>	<b>48</b>

## RESUMEN

Determinar si el extracto etanólico de las hojas del *Thymus vulgaris* presenta un efecto ansiolítico en *Rattus novergicus* (ratas Wistar)

Se realizó un estudio aplicativo y experimental. Se clasificaron a las ratas albinas en 5 grupos de acuerdo a la sustancia administrada, recibiendo tres de ellos extracto etanólico de las hojas del *Thymus vulgaris* en diferentes dosis, el cuarto grupo, clonazepam y el quinto grupo agua estéril como placebo, teniendo un total de 50 ratas.

Se encontró que el extracto etanólico de las hojas de *Thymus vulgaris* no presenta efecto ansiolítico estadísticamente significativo en *Rattus novergicus* ( $p > 0,05$ ), además se halló que el efecto ansiolítico de las hojas del *Thymus vulgaris* no es directamente proporcional a su dosis de administración.

El extracto etanólico de las hojas del *Thymus vulgaris* no presenta un efecto ansiolítico significativo en *Rattus novergicus*.

**Palabras clave:** *Thymus vulgaris*, clonazepam, efecto ansiolítico.

## ABSTRACT

Determinate if the ethanolic extract of the leaves of *Thymus vulgaris* has an anxiolytic effect in *Rattus novergicus* (Wistar rats)

An application and experimental study was carried out. The white rats were classified into 5 groups according to the substance administered, receiving three of them ethanolic extract from the leaves of *Thymus vulgaris* in different doses, the fourth group, clonazepam and the fifth, sterile water as a placebo, having a total of 50 rats.

It was found that the ethanolic extract of the leaves of *Thymus vulgaris* doesn't present an anxiolytic effect statistically significant in *Rattus novergicus* ( $p > 0.05$ ), furthermore it was found that the anxiolytic effect of the leaves of *Thymus vulgaris* is not directly proportional to its administration dose.

The ethanolic extract of the leaves of *Thymus vulgaris* doesn't present a significant anxiolytic effect in *Rattus novergicus*.

**Key words:** *Thymus vulgaris*, clonazepam, anxiolytic effect.

## I. INTRODUCCION

Según explica Komaki (2014), se considera a la ansiedad como uno de los trastornos más frecuentes a nivel mundial. De acuerdo con Horváth (2016) el trastorno de ansiedad se divide en varios subtipos, destacando principalmente dos, el rasgo de ansiedad y el estado de ansiedad; siendo el primero un tipo de personalidad, es decir presenta una respuesta de ansiedad crónica ante estímulos estresantes; mientras que el segundo sólo es una respuesta consciente y transitoria.

(1) (2) (3)

En el Perú, de acuerdo a lo que describe el Ministerio de Salud en el año 2016, los trastornos de ansiedad también se encuentran dentro de las principales enfermedades en este país y para evaluar la prevalencia de este padecimiento se realizó un estudio en el año 2012 el cual mostró que las enfermedades neuropsiquiátricas ocuparon el primer lugar de carga de enfermedad, concluyendo que, de ellas, los trastornos de ansiedad fueron los más frecuentes alcanzando el 14,9% del total y a la vez son los más tempranos en aparecer, siendo el promedio, los 15 años de edad. (4)

Al clasificar la prevalencia de los trastornos de ansiedad por grupo etario en el Perú, la prevalencia anual de dicho trastorno junto a la depresión en niños de 6 a 10 años fue de 3,5%, mientras que la prevalencia anual de sólo trastornos de ansiedad en adultos fue de 14,6% en la ciudad de Lima, 3,1% para las ciudades de la costa, 6,6% para los de la sierra, 6,2% para los de la selva, 7,7% para las ciudades de la frontera y 4,3% para las ciudades del Trapecio Andino según 6 estudios realizados entre el año 2002 y el año 2010. (4)



El 7 de Mayo de 1998 se aperturó en el Perú, por medio de la Resolución N° 487-GG-IPSS-98, el Programa de Medicina Complementaria en el que en su momento fue el Instituto Peruano de Seguridad. En dicho programa, se realizó una evaluación de la producción al año 2015 de las distintas dependencias en lo que corresponde a Medicina Complementaria observándose que los trastornos de ansiedad ocupan el tercer lugar de las enfermedades diagnosticadas, mostrando una prevalencia del 10 %.

También se realizaron múltiples estudios del trastorno de ansiedad en ámbitos laborales, como es el caso de un estudio realizado por Perales (2011) en la ciudad de Lima – Perú donde se comprobó que en una población de 1137 magistrados la ansiedad, depresión y estrés general, estuvieron presentes en el 6,6 % de ellos; mientras que el 25,9 %, tenían al menos una de estas condiciones.

En otro estudio realizado por Sánchez (2016) se analizó la prevalencia de ansiedad en un ambiente académico aplicado en 3 universidades de Lambayeque – Perú donde determinó que el 8.1% de los estudiantes encuestados presentaron ansiedad generalizada y el 5.9 %, trastornos de angustia.

A su vez en un estudio realizado por Piazza (2014) para determinar la prevalencia de trastornos mentales realizado en 5 ciudades del Perú, Lima, Arequipa, Huancayo, Iquitos y Chiclayo, se observó que a lo largo de 12 meses, la prevalencia de trastornos mentales fue de 13,5% siendo más frecuentes los trastornos de ansiedad (7,9%). También se demostró en este estudio que las personas viudas, separadas y divorciadas presentan mayor riesgo de ansiedad que los casados o convivientes.

Sin embargo, según asegura Souto (2011) a pesar de que se tiene disponibilidad de tratamiento con un gran arsenal de fármacos ansiolíticos sintéticos actualmente

disponibles en el mercado, muchas de estas opciones farmacéuticas, como las benzodiazepinas, resultan ser muy poco selectivas y presentan un estrecho margen de seguridad entre su efecto ansiolítico y los efectos secundarios no deseados; citando entre ellos por ejemplo, a la dependencia, el síndrome de abstinencia, relajación muscular, obnubilación, cansancio, incremento del tiempo de reacción, incoordinación motora, deficiencia de las funciones mentales y motoras, confusión, amnesia anterógrada, debilidad, cefalea, visión borrosa, vértigo, náuseas, vómitos, malestar epigástrico y diarrea principalmente y, en menor medida, se encontró también efectos secundarios como artralgias, dolor retroesternal e incontinencia. (3)

(9)

Hoy en día, gracias a la Medicina Complementaria, se ha brindado otras alternativas de tratamiento natural al lado de los fármacos ya disponibles en el mercado, para ello, se han descubierto una gran variedad de plantas que ejercen reconocidos efectos medicinales en el sistema nervioso central y que son capaces de actuar sobre las enfermedades crónicas tales como la ansiedad y la depresión que incluso, en determinadas situaciones, pueden mejorar el estado de los pacientes que no responden adecuadamente a los tratamientos terapéuticos convencionales, entre estas plantas se encuentra el *Thymus vulgaris*. (3)

Se sabe que a lo largo de esta década de acuerdo a lo que describe Hossain (2014) ha aumentado en gran medida el interés por los componentes naturales de las plantas utilizadas como alimentos o especias en busca de una fuente rica en bionutrientes y fitoquímicos bioactivos cuyas funciones antioxidantes destaquen, es así como la planta *Thymus vulgaris* también conocido como tomillo llamó la atención. (10)

El *Thymus vulgaris* es una planta medicinal aromática perteneciente a la familia Lamiaceae el cual se ha utilizado en la medicina popular desde los antiguos griegos, egipcios y romanos, siendo precisamente en la época romana donde se informa que se utilizó para protegerse contra la peste negra que golpeó en el década de 1340 según lo redacta Ahmad (2014). (10) (11) (12) (13) (14)

Con respecto al crecimiento del *Thymus vulgaris* en el Perú podemos decir que gracias a la gran capacidad de adaptación de esta planta puede crecer en diferentes tipos de suelo de este país pero se adapta mejor en suelos arenosos, con clima entre frío y templado, una humedad relativa entre 50 y 70%, en un campo abierto y a una altitud que oscila entre 0 y los 2 500 msnm. (15)

Una de las ciudades del Perú que cuenta con estas características ya mencionadas es Arequipa, un estudio donde se evaluó la situación agrícola de esta ciudad muestra que el *Thymus vulgaris* crece tanto a una altura alta, media como baja y los podemos encontrar en los distritos de Pocsi, Tuctumpaya, Puquina y Mollebaya. (16)

Característicamente el *Thymus vulgaris* es un pequeño arbusto de aproximadamente 25 cm de alto, con tallo y ramas cuadrangulares, sus hojas miden 6 a 12mm de largo, son de forma oval, grueso y liso. Esta, cuenta con una gran variedad de compuestos químicos, entre ellos destacan los aceites esenciales, las sustancias fenólicas y los flavonoides presentando todos ellos una gran actividad antioxidante. Sus principales aceites esenciales son los monoterpenos fenólicos, timol (40-80% de todos sus aceites esenciales) y carvacrol (55-100% de todos sus aceites esenciales); los cuales, como podemos ver, se presentan en una alta concentración. (10) (11) (14) (17) (18) (19) (20)

Otros aceites esenciales también presentes son el p-cimeno, mirceno, borneol, cineol (7%) p-cimeno (15%), linalool (3%), limoneno (12%) terpineno (7%) borneol (4%) pineno (4%) y alcanfor (2%). También se han encontrado compuestos fenólicos como ácido caféico y derivados de ácido rosmarínico. (10) (11) (12) (13) (20)

El extracto etanólico de *Thymus vulgaris* generalmente se obtiene en un laboratorio según refiere Paredo (2009), en el cual por medio del uso del alcohol (disolvente) se obtiene un macerado al dejarlo reposar por un tiempo ya definido, dicho alcohol posteriormente es retirado del extracto evaporándolo generalmente por medio de rotavapores, dejando así la esencia de la planta junto a otros elementos solubilizados que conforman el llamado extracto impuro. (21)

Según explican Yanés (2014) y Cáceres (2014) Entre los principales componentes encontrados en el extracto etanólico de las hojas de *Thymus vulgaris* además de los aceites esenciales encontramos compuestos polares como saponinas, taninas, flavonoides, esteroides y terpenos, además de polifenoles, alcaloides, cumarinas y quinonas.(22) (23)

En el año 2012 se realizó un estudio en Brasil por Nin.et al. Quien evaluó el efecto ansiolítico del clonazepam en un grupo de ratas hembras durante diferentes etapas de su ciclo hormonal por medio del Laberinto en Cruz Elevado; en este estudio se decidió administrar una dosis de clonazepam de 0,25mg/kg. (24)

En el estudio de Alireza Komaki, et al. Realizado el 2014 en Irán, demostró por medio del Laberinto Elevado en Cruz (LEC) que el consumo de extracto de *Thymus vulgaris* a dosis de 50 mg/kg, 100 mg/kg y 200 mg/kg administrado por 7 días,

disminuía proporcionalmente la ansiedad en ratas de laboratorio , sin influenciar en su actividad locomotora. (25)

En el año 2011, Flavia Negromonte, et al. Realizaron un estudio experimental en un grupo de ratones macho, observaron que al hacer inhalar oxido de linalol, compuesto que se encuentran en algunas plantas aromáticas como el *Thymus vulgaris*, éste se comportaba como un agente ansiolítico, el cual fue comprobado a través de dos pruebas: el Laberinto en Cruz Elevado y la Prueba de la Caja con Luz y Oscuridad. (3)

En un estudio realizado por Ranil Waliwitiya et al. (2010) el cual se le administró una solución proveniente de la planta de timol, sustancia presente en el *Thymus vulgaris*, a un grupo de moscas para realizar un estudio experimental y comprobar la acción de esta planta, se encontró una gran similitud en la acción de timol comparado con GABA lo que sugirió que este terpenoide actúa en el sistema nervioso central de las moscas imitando o facilitando la acción del GABA (26)

De acuerdo con Sharp (2012) las ratas de laboratorio han sido usadas como animales experimentales para estudios neuroanatómicos desde el año 1800 en EEUU y Europa. Además han sido utilizados para realizar cirugía experimental y en evaluaciones de nutrición, siendo el ratón el animal de laboratorio del cual nos servimos para conocer la reacción de un organismo mamífero frente a un estímulo exógeno experimental. (27) (28)

Según explica Hopkins (2015) las ratas de laboratorio generalmente se les alimenta con una dieta baja en fibra (5%), proteína (20%) y grasa (10%), el cual puede ser paletizada o en polvo. Generalmente se les alimenta a libre demanda y consumen en promedio 20 gramos al día. El agua también se le brinda a libre demanda y

usualmente toman en promedio 35ml al día. Esta se suministra usando una botella o regaderas automáticas. (28)

Para cumplir correctamente los principios de importación de animales de laboratorio según redacta Fuentes (2008) se deben seguir las normas estipuladas por el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) del Perú. Además es indispensable que al realizar estudios experimentales con animales de laboratorio, se debe intentar minimizar el dolor o la angustia que estos puedan sufrir. (29)

## **1.1 JUSTIFICACIÓN**

En los tiempos actuales, la ansiedad es uno de los trastornos mentales más comunes a nivel mundial el cual, si bien es posible tratar a estos pacientes con drogas sintéticas, además del alto costo que presentan, éstos suelen tener múltiples efectos secundarios que dificultan su uso continuo, entre ellos destacando la dependencia al medicamento, el síndrome de abstinencia y la reducción de la capacidad motriz.

Otra de las razones actuales por la que es conveniente realizar este estudio es dar atención a la tendencia que se observa a nivel mundial sobre la preferencia del uso de plantas medicinales, siendo el tratamiento de la ansiedad, uno de los campos más apreciados de su uso, por lo que es relevante realizar estudios que asocien el tratamiento de dicha patología con plantas como el *Thymus vulgaris*.

Además no se ha encontrado aún la eficacia que se desea al tratar sólo con fármacos sintéticos a los pacientes con ansiedad, es por ello que se debe agregar como plan de tratamiento el uso frecuente de *Thymus vulgaris*.

De esta manera debido a la gran carga histórica que presentan las plantas medicinales que datan de miles de años de conocimiento que ha sido transmitido de generación a generación y también debido al impacto cada vez mayor que está teniendo esta modalidad terapéutica sobre la comunidad, se propone que ingrese al mercado una terapia para tratar los trastornos de ansiedad que sea natural, aceptado por las personas, con ausencia de efectos secundarios y que esté además al alcance económico de la mayoría de la población, para que de esta manera complemente a los tratamientos ya existentes.

Además, el presente estudio servirá de base para realizar otros de mayor envergadura que consideren al *Thymus vulgaris* como planta ansiolítica en un tamaño muestral más grande y demostrado ello, posteriormente, sea estudiado y validado en humanos.

## **1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA CIENTÍFICO**

¿Presenta el extracto etanólico de las hojas de *Thymus vulgaris* actividad ansiolítica en *Rattus norvegicus*?

## **1.3 HIPÓTESIS**

**H<sub>1</sub>** El extracto etanólico de las hojas del *Thymus vulgaris* sí presenta efecto ansiolítico en *Rattus norvegicus*.

**H<sub>0</sub>**: El extracto etanólico de las hojas del *Thymus vulgaris* no presenta efecto ansiolítico en *Rattus norvegicus*.

## **1.4 OBJETIVOS**

### **1.4.1 Objetivo General**

Determinar que el extracto etanólico de las hojas del *Thymus vulgaris* presenta un efecto ansiolítico en *Rattus norvegicus*.

#### **1.4.2 Objetivos Específicos**

Evaluar la actividad ansiolítica a través del número de entradas y tiempo en los brazos abiertos y cerrados del Laberinto en Cruz Elevado en los grupos de estudio que recibieron el extracto etanólico de las hojas de *Thymus vulgaris* a dosis de 50, 100 y 200 mg/kg.

Comparar la actividad ansiolítica obtenida en los grupos de estudio con el grupo que recibió clonazepam y el grupo placebo que recibió agua estéril.



## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

#### 2.1.1 Población Muestral

La población de estudio fue constituida por 50 *Rattus norvegicus* hembras provenientes del bioterio de la Universidad los Ángeles de Chimbote (ULADECH) en aparente buen estado de salud, los cuales fueron distribuidas aleatoriamente en número de 10 para cada uno de los 5 grupos de investigación (dieta con administración de *Thymus vulgaris* a concentración de 50 mg / kg, dieta con administración de *Thymus vulgaris* a concentración de 100 mg / kg, dieta con administración de *Thymus vulgaris* a concentración de 200 mg / kg, dieta normal con administración de agua estéril y dieta normal con administración de clonazepam a concentración de 0,25 mg / kg).

#### Criterios de Inclusión

- *Rattus norvegicus* hembras provenientes del bioterio de la Universidad los Ángeles de Chimbote (ULADECH) en aparente buen estado de salud
- *Rattus norvegicus* hembras cuyos pesos se hallen comprendidos entre 100 a 150 gramos
- *Rattus norvegicus* hembras cuyas edades se encuentren comprendidas entre 2 a 6 meses
- *Rattus norvegicus* hembras no manipuladas experimentalmente

#### Criterios de exclusión

- *Rattus norvegicus* machos

- *Rattus norvegicus* preñadas
- *Rattus norvegicus* que hayan participado en estudios experimentales previos

### **Criterios de eliminación**

- Animales que fallezcan durante el estudio
- Animales que manifiesten durante el estudio sintomatología propia de una enfermedad que estuvo latente.

### **2.1.2 Muestra**

#### **Unidad de Análisis**

La unidad de análisis fue constituida por la rata de laboratorio hembra de la línea Wistar, especie *Rattus norvegicus*.

### **2.1.3 Muestreo**

- Se utilizó el muestreo probabilístico aleatorio simple. La aleatorización nos aseguró que cada elemento o unidad de análisis tenga la misma probabilidad de ser elegido para cualquiera de los 5 grupos que se investigarán.
- Para ello se enumeraron del 1 al 50 papeles de color blanco de 4 cm x 4 cm los cuales luego de la numeración fueron doblados (4 dobleces en cada uno de ellos).
- Cada número representó correspondientemente a cada una de las especies *Rattus norvegicus* hembras participantes en el estudio. Los 50 papeles doblados fueron colocados en una caja y se revolvieron.
- Luego mediante sorteo simple se fueron sacando de uno en uno cada papel doblado y se fue asignando en forma progresiva a cada uno de los grupos establecidos: G1: dieta con administración de *Thymus vulgaris* a concentración de

50 mg / kg, G2: dieta con administración de *Thymus vulgaris* a concentración de 100 mg / kg, G3: dieta con administración de *Thymus vulgaris* a concentración de 200 mg / kg, G4: dieta normal con administración de agua estéril y G5: dieta normal con administración de clonazepam a concentración de 0,25 mg / kg.

### Tamaño muestral

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó la siguiente fórmula (30):

$$n = \frac{2.(Z\alpha + Z\beta)^2.\delta^2}{(d)^2}$$

Donde:

- n = número de sujetos necesarios en cada una de las muestras, que para el presente estudio fueron constituidas por *Rattus norvegicus* hembras.
- $Z\alpha$  = valor Z correspondiente al riesgo deseado (1,96).
- $Z\beta$  = valor Z correspondiente al riesgo deseado (0,84).
- $\delta$  = varianza de la variable cuantitativa que tiene el grupo control o de referencia (0,36 según el estudio de Correa).
- d = valor mínimo de la diferencia que se desea detectar (0,5).

Hallándose un  $n = 8,12$ , es decir se requirieron 8 *Rattus norvegicus* hembras para cada uno de los grupos. Con la finalidad de incrementar la validez interna de la investigación se trabajó con un  $n = 10$  para cada uno de los 5 grupos de estudio haciendo así un tamaño de muestra total requerido de 50 ratas Wistar hembras.

## 2.2 DISEÑO DE ESTUDIO

### 2.2.1 Tipo de Estudio

La presente investigación fue de tipo aplicada, prospectiva, transversal y experimental

### 2.2.2 Diseño Específico

- El diseño específico de la presente investigación corresponde a un estudio experimental con post-prueba únicamente, tres grupos de estudio y dos de control (basal y comparativo).

- Su formato general es:

RG <sub>1</sub> _____	X <sub>1</sub> _____	O <sub>1</sub>
RG <sub>2</sub> _____	X <sub>2</sub> _____	O <sub>2</sub>
RG <sub>3</sub> _____	X <sub>3</sub> _____	O <sub>3</sub>
RG <sub>4</sub> _____	X <sub>4</sub> _____	O <sub>4</sub>
RG <sub>5</sub> _____	-- _____	O <sub>5</sub>

Dónde:

- R: aleatorización.
- G<sub>1</sub>: grupo de *Rattus norvegicus* hembras.
- G<sub>2</sub>: grupo de *Rattus norvegicus* hembras.
- G<sub>3</sub>: grupo de *Rattus norvegicus* hembras.
- G<sub>4</sub>: grupo de *Rattus norvegicus* hembras.
- G<sub>5</sub>: grupo de *Rattus norvegicus* hembras.
- X<sub>1</sub>: dieta con administración de *Thymus vulgaris* a 50mg/kg.
- X<sub>2</sub>: dieta con administración de *Thymus vulgaris* a 100mg/kg.
- X<sub>3</sub>: dieta con administración de *Thymus vulgaris* a 200mg/kg.
- X<sub>4</sub>: dieta con administración de clonazepam a 0,25mg/kg.

- --: dieta normal con administración de agua estéril (sustancia placebo).
- O<sub>1</sub>: evaluación filmada del primer grupo en la prueba de estrés del laberinto en cruz elevado.
- O<sub>2</sub>: evaluación filmada del segundo grupo en la prueba de estrés del laberinto en cruz elevado.
- O<sub>3</sub>: evaluación filmada del tercer grupo en la prueba de estrés del laberinto en cruz elevado.
- O<sub>4</sub>: evaluación filmada del cuarto grupo en la prueba de estrés del laberinto en cruz elevado.
- O<sub>5</sub>: evaluación filmada del quinto grupo en la prueba de estrés del laberinto en cruz elevado.

- En este tipo de diseño específico se usaron dos tratamientos experimentales (*Thymus vulgaris* en tres dosis diferentes y clonazepam), los animales de laboratorio fueron asignados al azar en cada grupo. los efectos de los tratamientos experimentales se investigaron comparando las post-pruebas de los grupos.

### 2.3 VARIABLES, DEFINICION OPERACIONAL Y ESCALA DE MEDICIÓN

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	ESCALAS DE MEDICIÓN
Extracto etanólico de las hojas de <i>Thymus vulgaris</i>	Independiente	Componentes de una planta medicinal de la familia de las labiadas cuyos efectos se producen por medio de sus aceites esenciales, flavonoides, ácidos fenólicos, triterpenos, saponinas y taninos. (25)	Administración complementaria en la dieta de los especímenes <i>Rattus norvegicus</i> por vía oral en concentraciones de 50 mg/Kg, 100 mg/Kg y 200 mg/Kg.	Categoría Nominal  Si / No
Efecto Ansiolítico	Dependiente	Efecto caracterizado por disminuir o eliminar los síntomas de la ansiedad independientemente de la posibilidad de producir sedación o sueño (9)	Determinación del número de entradas en los brazos del Laberinto en Cruz Elevado contando como "entrada" cuando la rata coloca las 4 patas dentro uno de los brazos.	Cuantitativa  Número total de entradas en los brazos abiertos.  Número total de entradas en los brazos cerrados.

Clonazepam	Interviniente	Droga medicinal agonista de la acción de GABA que presenta acción depresora sobre el sistema nervioso central con el objetivo de atenuar los síntomas de ansiedad. (24)	Administración complementaria de en la dieta de los especímenes <i>Rattus norvegicus</i> por vía oral en concentraciones de 0,25 mg/Kg.	Categórica Nominal  Si / No

## 2.4 PROCEDIMIENTOS

### 2.4.1 Obtención del Laberinto en Cruz Elevado

El laberinto en cruz elevado fue proporcionado por la Facultad de Farmacia de la Universidad Nacional de Trujillo el cual fue diseñado y confeccionado de acuerdo a las especificaciones de Pellow:

- El laberinto fue conformado por dos brazos abiertos (L: 50 cm x A: 10 cm), sin paredes laterales ni techo, dispuestos perpendicularmente a dos brazos cerrados por paredes laterales de madera, desprovistos de techo (L: 50 cm x A: 10 cm x H: 0 cm).
- Alrededor de los brazos abiertos fueron acopladas láminas de madera que tuvieron 1 cm de altura, con la intención de evitar que los animales caigan del laberinto.

(Anexo 2 y 3)

- Los brazos cerrados tuvieron una medida igual a los brazos abiertos (L: 50 cm x A: 10 cm) dispuestos perpendicularmente a los brazos abiertos con paredes cerradas de 40 cm (L: 50 cm x A: 10 cm x H: 40 cm)
- El sistema de soporte fue constituida por 5 bases de madera de 85cm de largo apoyados 4 a los extremos y 1 en el centro
- El centro del laberinto estará acoplado con los 4 brazos (2 abiertos y 2 cerrados) y tendrá una medida de 10cm x 10cm. (24)

#### **2.4.2 Obtención, extracción etanólica y posterior redosificación de las hojas de *Thymus vulgaris***

La planta *Thymus vulgaris* fue adquirida a un proveedor quien la trajo desde su localidad de origen (Arequipa). Se procedió luego a identificar la planta en el Herbario de la Universidad Privada Antenor Orrego de la ciudad de Trujillo- Perú (Anexo 4).

Posteriormente se recolectaron desde las plantas adquiridas , las hojas de *Thymus vulgaris* y, con el apoyo de químicos farmacéuticos de la Farmacia Natural del Centro de Atención de Medicina Complementaria de EsSalud de Trujillo, se realizó el proceso de extracción etanólica de las hojas de esta planta; el cual consistió en dejar secar las hojas en un ambiente a 22.3°C debajo y sobre papel Kraft por 24 horas (Anexo 5 ) para luego ser terminadas de secar por medio de una Estufa a 45 °C por 24 horas más (Anexo 6)

Seguidamente fueron trituradas por medio del uso de un Tamiz de 850 micras (Anexo 7), luego se extrajo el extracto por el método de percolación con etanol de 70° a temperatura ambiente (22°C) en el Centro de Atención de Medicina Complementaria de EsSalud (Anexo 8),



El extracto obtenido se llevó al laboratorio de Instrumentales de la Universidad Nacional de Trujillo para realizar el proceso de evaporación por medio de un Rota-Vapor, a través del cual se eliminó la mayor parte del etanol utilizado para la extracción (Anexo 9). (25) (31)

Por motivos de no disponibilidad de un Liofilizador no se realizó el proceso final que es el de liofilización. En su lugar, se colocó el extracto etanólico en placas Petri (Anexo 10) y se dejó secar por 72 horas en la Estufa a 45°C para posteriormente ser raspado con el uso de una hoja bisturí, el polvo resultante de consistencia acaramelada se redosificó en el Hospital Víctor Lazarte Echegaray en agua estéril para la administración futura a 6.5mg/ mL.(Anexo 11)

#### **2.4.3 Obtención y redosificación de las tabletas de Clonazepám**

Se adquirieron tres tabletas de Clonazepám de 2mg las cuales fueron redosificadas en el Hospital Víctor Lazarte Echegaray con agua estéril para la administración posterior a una dosis de 0.125mg/mL (Anexo 12)

#### **2.4.4 Obtención de las ratas de laboratorio**

Se seleccionaron 50 especímenes de *Rattus norvegicus* hembras provenientes del bioterio de la Universidad los Ángeles de Chimbote (ULADECH) (Anexo 13 ) que cumplieron los criterios de inclusión establecidos para el presente estudio: aparente buen estado de salud, peso comprendido entre 100 a 150 gramos, edad comprendida entre 2 y 6 meses e ingenuas experimentalmente.

#### **2.4.5 Asignación de las jaulas para cada grupo de estudio**

Los animales – en número de 10 – fueron colocados en jaulas de acero inoxidable y plástico de 50 x 30 x 20 cm<sup>3</sup> con la finalidad de que en un número reducido y en un ambiente amplio puedan evitarse situaciones de estrés y/o agresividad entre ellas mismas.

#### **2.4.6 Periodo de adaptación**

Una vez asignadas en las jaulas pasaron por un periodo de adaptación de tres días en los establecimientos del Laboratorio de Farmacia de la Facultad de Medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego (Pabellón M) (Anexo 14 ) a una temperatura de 20 +/- 2° C, en un ciclo regular de luz – oscuridad 12: 12 y alimentados libremente con agua y alimento para roedores, que constituyó en alimento en polvo con una cantidad de fibra baja (5%), proteína (20%) y grasa (5-10%), este será a libre demanda, el agua también se le brindó a libre demanda siendo mantenidos todas ellas bajo las mismas condiciones durante 7 días.

#### **2.4.7 Designación aleatoria de cada rata para su respectivo grupo de estudio**

Luego del periodo de adaptación las ratas fueron separadas al azar mediante muestreo probabilístico aleatorio simple y se distribuyeron 10 de ellas en cada uno de los 5 grupos que se investigaron; para ello se enumeraron del 1 al 50 papeles de color blanco de 4 cm x 4 cm los cuales luego de la numeración fueron doblados (4 dobleces en cada uno de ellos). Cada número representó correspondientemente a cada una de las ratas Wistar hembras participantes en el estudio.

Los 50 papeles doblados fueron colocados en una caja y se revolvieron, luego mediante sorteo simple se fueron sacando de uno en uno cada papel doblado y se

fue asignando en forma progresiva a cada uno de los grupos establecidos: G1: dieta con administración de *Thymus vulgaris* a concentración de 50 mg /kg /día, correspondiendo alrededor de 1 ml de la sustancia redosificada adicionando 3 ml de agua estéril para llegar a un total de 4ml (con el objetivo de evitar sesgo por administración de diferentes cantidades de líquido) G2: dieta con administración de *Thymus vulgaris* a concentración de 100 mg /kg /día correspondiendo alrededor de 2 ml de la sustancia redosificada adicionando 2 ml de agua estéril para llegar a un total de 4ml, G3: dieta con administración de *Thymus vulgaris* a concentración de 200 mg /kg /día correspondiendo alrededor de 4 ml de la sustancia redosificada sin adicionar agua estéril, G4: dieta normal con administración de clonazepam a concentración de 0,25 mg /kg /día correspondiendo alrededor de 0.25 ml de la sustancia redosificada adicionando 3.75 ml de agua estéril para llegar a un total de 4ml y G5: dieta normal con administración de 4ml de agua estéril. Todos ellos administrados por sonda orogástrica (Anexo 15)

Se decidió utilizar un grupo que recibió placebo (agua estéril) para comprobar el efecto ansiolítico del *Thymus vulgaris* y se utilizó el grupo que recibió clonazepam para comparar la eficacia entre el *Thymus vulgaris* y esta benzodiazepina.

#### **2.4.8 Periodo de administración del ansiolítico y placebo**

Durante 7 días y según asignación permanecerán cada grupo con la coadministración dieta – tratamiento en las condiciones de alojamiento ya descritas. La administración del medicamento se realizó todos los días a las 13:00 horas siendo pesados justo antes de que reciban el medicamento.

Dado que las ratas pesan entre 100 y 150mg el procedimiento de administración del tratamiento se realizó de la siguiente manera, para la administración de *Thymus*

vulgaris a 50mg/kg, teniendo una concentración de 6.5mg/ml le correspondió una administración de 0.76 a 1.15ml del medicamento; para el grupo que recibió Thymus vulgaris a 100mg/kg, teniendo la misma concentración de 6.5mg/ml le correspondió entre 1.52 a 2.3ml y para el grupo que recibió Thymus vulgaris a 200mg/kg le correspondió entre 3.04 a 4.6ml del medicamento. Con respecto a la administración de clonazepam a 0.25mg/kg, teniendo una concentración de 0.125mg/ml de solución le correspondió recibir entre 0.2 a 0.3ml del medicamento.

Para que todos los grupos de estudio tengan el mismo volumen de tratamiento se decidió administrar un total de 4.6ml de líquido complementando el volumen que se necesitaba con agua estéril. Por último todos los integrantes del grupo placebo recibieron 4.6ml de agua estéril.

#### **2.4.9 Periodo experimental**

Luego de ello se dio inicio a la sesión experimental (para efectos del presente estudio se entiende como sesión experimental el espacio de tiempo transcurrido entre la preparación de un sujeto para ser expuesto al laberinto, el periodo de exploración definido, que será de 10 minutos, y la preparación del laberinto para el siguiente sujeto) la cual fue filmada mediante el uso de una cámara de video la cual permitió el registro de: tiempo de permanencia en los brazos abiertos y cerrados, entradas a los brazos abiertos, entradas a los brazos cerrados; estableciéndose una entrada en un brazo cuando el animal cruce la línea que los divide con las 4 patas.

Se dio inicio a la fase experimental con cada uno de los 10 sujetos de cada grupo de investigación, el cual se llevó a cabo de la siguiente forma:

- Se intentaron garantizar iguales condiciones de luminosidad, ruido y temperatura antes de iniciar las sesiones experimentales.

- Cada sujeto fue colocado en el centro del laberinto y se le permitió explorarlo por un tiempo de 10 minutos.
- Al finalizar el tiempo de exploración definido, el sujeto fue retirado del laberinto y colocado en otra jaula diferencial.
- Antes de colocar el segundo sujeto se limpiaron los cuatro brazos del laberinto retirando cualquier residuo dejado por el animal durante su periodo de exploración, pasando por las paredes y los pisos de los brazos del laberinto un paño humedecido en alcohol (10 %).
- Esta limpieza se realizó con el objetivo de evitar la presencia de claves odoríferas dejadas por el sujeto colocado previamente, y que eventualmente puedan influir sobre el comportamiento exploratorio del siguiente sujeto.
- De igual forma sistemática se procedió con el resto de la población en estudio en forma consecutiva.

#### **2.4.10 Registro de información en una base de datos**

Todos los datos registrados en la videocámara fueron consignados en una base de datos dentro programa Excel.

#### **2.4.11 Evaluación de la información a través del programa SPSS 20.0**

Luego la data fue ingresada al programa SPSS 20.0 en español para su posterior análisis estadístico.

## **2.5 ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE LA INFORMACIÓN**

### **2.5.1 Procesamiento:**

- Los datos obtenidos fueron registrados en una base de datos dentro programa Excel.
- La información fue procesada mediante el uso del paquete estadístico SPSS 20.0 en español.

### **2.5.2 Análisis Estadístico:**

#### **Estadística Descriptiva:**

- Los resultados obtenidos se expresaron como medias aritméticas y su correspondiente error estándar.

#### **Estadística Analítica:**

- Se utilizó como nivel de significancia 0,05 siendo significativo un valor  $p < 0,05$  y no significativo un valor  $p > 0,05$ .
- Se realizó la prueba inferencial inter-grupo paramétrica. La metodología estadística aplicada en el análisis de los valores obtenidos fue la siguiente:
  - Al cumplirse los resultados de normalidad y homocedasticidad se recurrió al análisis de varianza paramétrica (ANOVA) de una vía, cuyo objetivo fue comparar los promedios de las variables estudiadas en los cinco grupos.
  - Se pretendía utilizar la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, en el caso en de que la prueba de ANOVA resultase significativa.
  - En caso de que no se hubiesen cumplido los requisitos de normalidad y/o homocedasticidad se hubiese recurrido al análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis
  - La prueba de comparaciones múltiples no paramétrico de Dunn hubiese sido aplicada en caso de que la prueba de Kruskal – Wallis resulte significativa.

## 2.6 ASPECTOS ÉTICOS

El presente estudio contó con la aprobación del Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego de Trujillo.

Además el personal investigador presentó una capacitación previa en la manipulación de animales de experimentación con la finalidad de garantizar el adecuado manejo de los mismos y la concientización del respeto y el derecho de todo ser vivo en cuanto a su participación en pro del desarrollo de la ciencia y el desarrollo del conocimiento científico.

## III. RESULTADOS

Durante el periodo de adaptación y administración del medicamento fallecieron 13 ratas (Anexo 16) y enfermó una, quedando un total de 36 *Rattus norvegicus* quienes fueron evaluadas mediante la exploración libre en el Laberinto en Cruz Elevado durante un total de 10 minutos cada una, dicha exploración fue filmada, analizada y procesada en una base de datos para la aplicación del estudio estadístico correspondiente.

La **Tabla 01** muestra la distribución de las variables cuantitativas según el grupo de estudio incluyendo al grupo que recibió clonazepam a 0,25mg/kg, se aplicó la prueba paramétrica ANOVA mostrando un valor p de 0,012 y 0,035 en la comparación de medias de los brazos abiertos y los brazos cerrados respectivamente, al ser la prueba significativa se aplicó la prueba de Tukey para observar que grupos hicieron

la diferencia estadística, mostrando que los grupos que hicieron dicha diferencia fue el grupo 3 (*Thymus vulgaris* 200mg/kg) y el grupo 5 (clonazepam 0,25mg/kg).

Dado este resultado, se realizó otra prueba de Análisis de Varianza, esta vez, sin incluir al grupo 5. La **Tabla 02** muestra la distribución de las variables cuantitativas según el grupo de estudio sin incluir al grupo 5 (clonazepam 0,25mg/kg); se aplicó la prueba paramétrica de Análisis de Varianza (ANOVA) para hallar la significancia estadística ( $p < 0,05$ ) mostrando que la media del número de entradas en el brazo abierto y la media del número de entradas en el brazo cerrado dio un valor p de 0,266 y 0,769 respectivamente aceptando, de esta manera, la hipótesis nula el cual refiere que el extracto etanólico de las hojas del *Thymus vulgaris* no presenta un efecto ansiolítico en *Rattus norvegicus*.

La **Figura 01 y 02** muestra un diagrama de caja y bigotes del tiempo en los brazos abiertos y cerrados respectivamente, mientras que la **Figura 03 y 04** muestran los diagramas en relación al número de entrada en los brazos abiertos y cerrados.

Durante el periodo de adaptación falleció un espécimen del grupo control (placebo), durante el periodo de administración de medicamentos fallecieron cinco especímenes del grupo que recibió *Thymus vulgaris* a 200mg/kg, tres de los que recibieron clonazepam, dos de los que recibieron placebo, uno de los que recibieron *Thymus vulgaris* a 100mg/kg y uno de los que recibieron *Thymus vulgaris* a 50mg/kg; en total fallecieron 13 ratas y enfermó una del grupo que recibió placebo.



**Tabla 1**

**Distribución del tiempo y número de entradas en los brazos del Laberinto en Cruz Elevado por grupo de estudio para la evaluación estadística del efecto ansiolítico. (5 grupos)**

Variable	Grupo 1 Thymus vulgaris a 50mg/kg	Grupo 2 Thymus vulgaris a 100mg/kg	Grupo 3 Thymus vulgaris a 200mg/kg	Grupo 4 Agua estéril (Placebo)	Grupo 5 Clonazepam 0.25mg/kg	Valor p
Tiempo en Brazo abierto	79,78 ± 66,88	71,67 ± 45,76	33 ± 38,99	45 ± 29,83	77,14 ± 27,06	0,309
Tiempo en Brazo cerrado	490,67 ± 75,68	495,33 ± 67,35	559 ± 51,16	531,67 ± 42,62	494,29 ± 15,92	0,190
# entradas en brazo abierto	4,33 ± 3,64	4,56 ± 2,60	1,60 ± 2,07	3,17 ± 2,23	7,57 ± 2,44	0,012
# entradas en brazo cerrado	8,89 ± 5,78	10,56 ± 7,04	7,20 ± 3,63	10 ± 5,97	17,43 ± 5,44	0,035

ANOVA. TUKEY 3,5.

**Tabla 2**

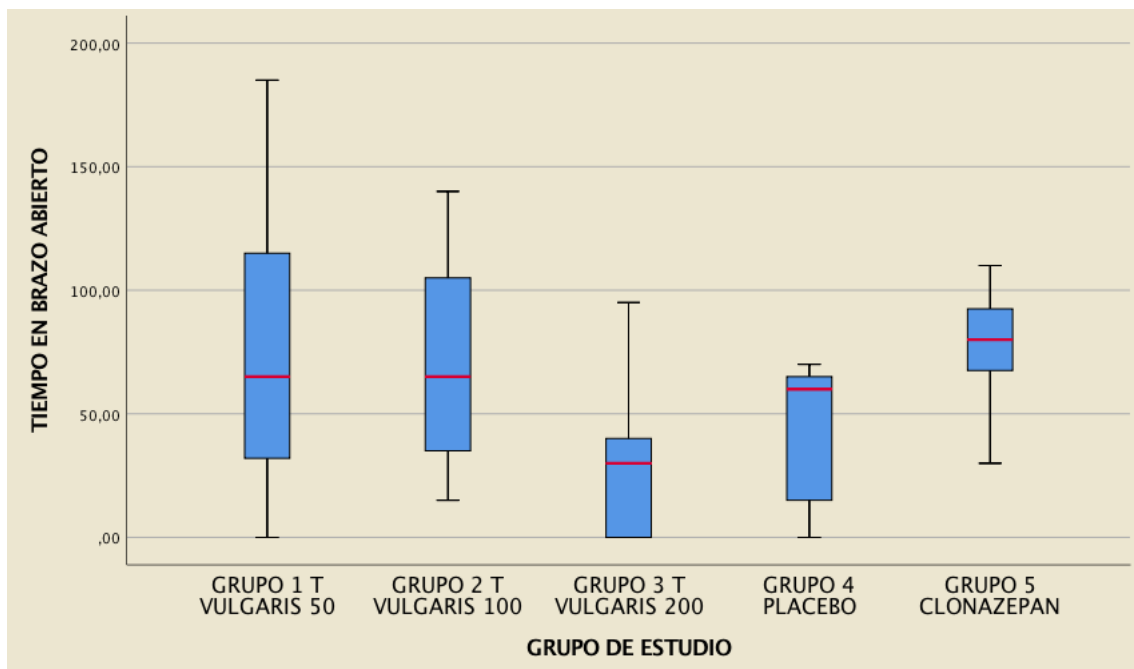
**Distribución del tiempo y número de entradas en los brazos del Laberinto en Cruz Elevado por grupo de estudio para la evaluación estadística del efecto ansiolítico sin incluir al grupo 5**

<b>Variable</b>	<b>Grupo 1</b> Thymus vulgaris a 50mg/kg	<b>Grupo 2</b> Thymus vulgaris a 100mg/	<b>Grupo 3</b> Thymus vulgaris a 200mg/kg	<b>Grupo 4</b> Agua estéril (Placebo)	<b>Valor p</b>
<b>Tiempo en Brazo abierto</b>	<b>79,78 ± 66,88</b>	<b>71,67 ± 45,76</b>	<b>33 ± 38,99</b>	<b>45 ± 29,83</b>	<b>0,306</b>
<b>Tiempo en Brazo cerrado</b>	<b>490,67 ± 75,68</b>	<b>495,33 ± 67,35</b>	<b>559 ± 51,16</b>	<b>531,67 ± 42,62</b>	<b>0,206</b>
<b># entradas en brazo abierto</b>	<b>4,33 ± 3,64</b>	<b>4,56 ± 2,60</b>	<b>1,60 ± 2,07</b>	<b>3,17 ± 2,23</b>	<b>0,266</b>
<b># entradas en brazo cerrado</b>	<b>8,89 ± 5,78</b>	<b>10,56 ± 7,04</b>	<b>7,20 ± 3,63</b>	<b>10 ± 5,97</b>	<b>0,769</b>

ANOVA

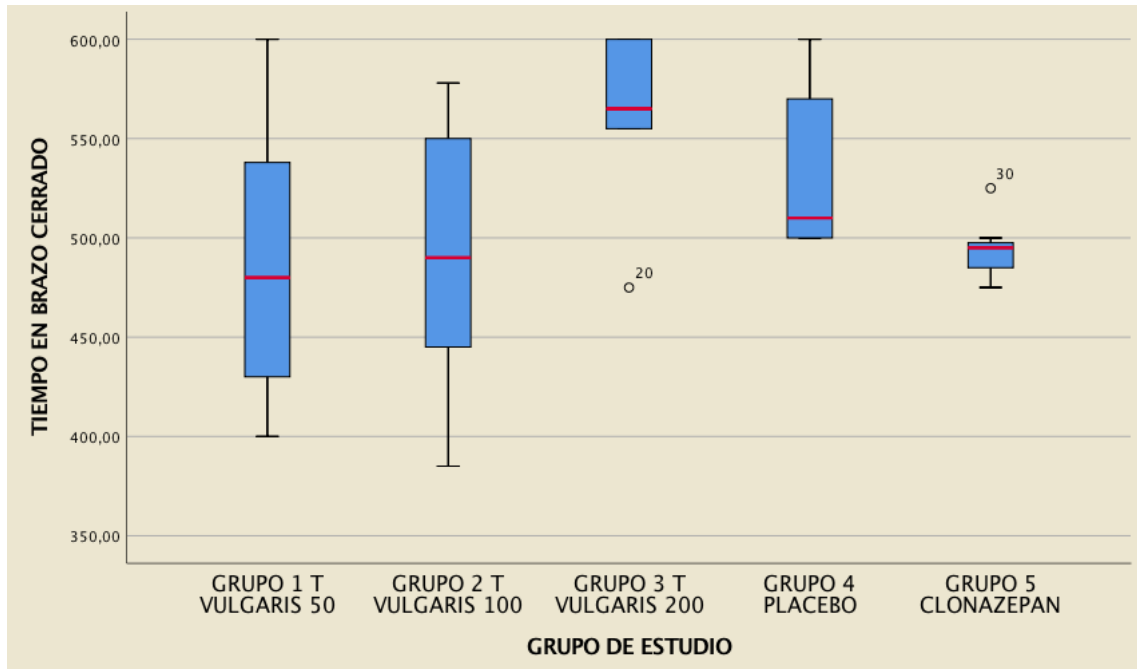
**Figura 1**

**Diagrama del tiempo en brazo abierto del Laberinto en Cruz Elevado según grupo de estudio para la evaluación estadística del efecto ansiolítico**



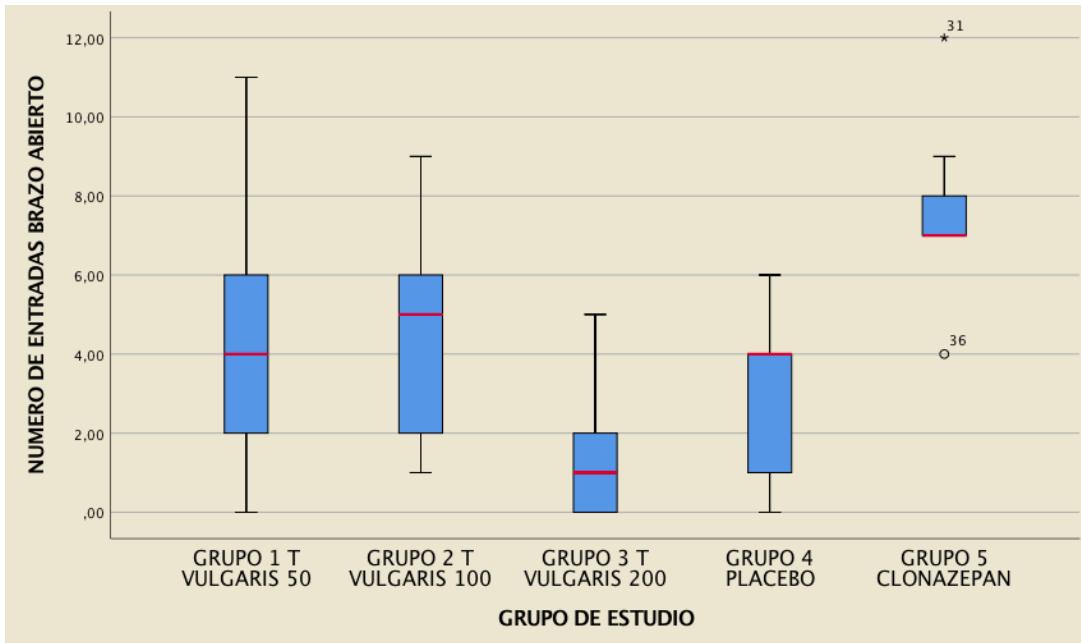
**Figura 2**

**Diagrama del tiempo en brazo cerrado del Laberinto en Cruz Elevado según grupo de estudio para la evaluación estadística del efecto ansiolítico**



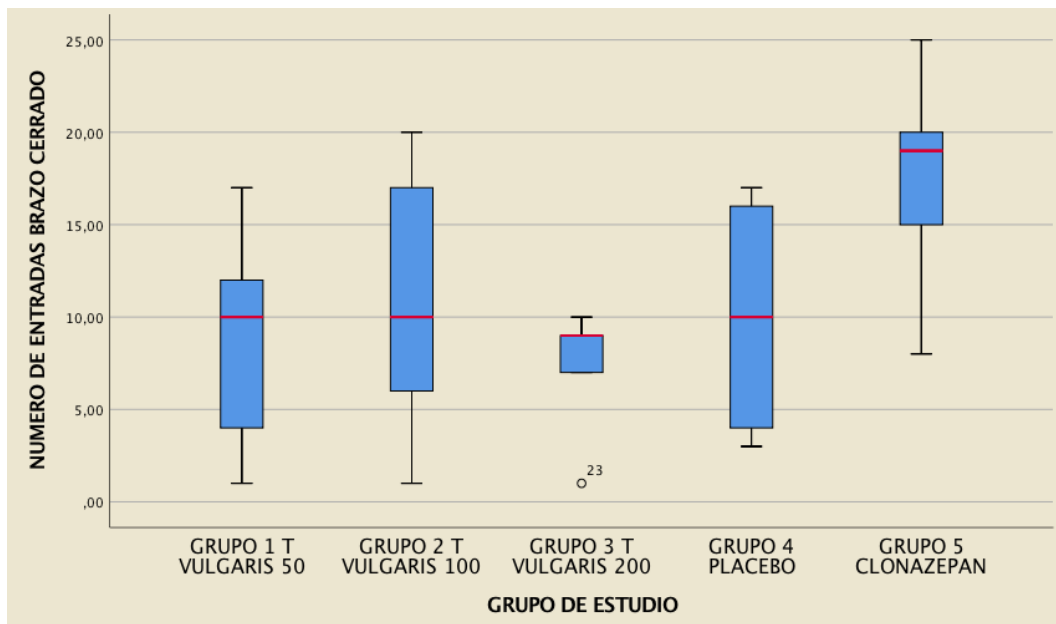
**Figura 3**

**Diagrama del número de entradas en el brazo abierto del Laberinto en Cruz Elevado según grupo de estudio para la evaluación estadística del efecto ansiolítico**



**Figura 4**

**Diagrama del número de entradas en el brazo cerrado del Laberinto en Cruz Elevado según grupo de estudio para la evaluación estadística del efecto ansiolítico**



#### IV. DISCUSIÓN

Dada la alta tasa de ansiedad reportada en nuestro país y a nivel mundial se está buscando hoy en día alternativas terapéuticas diferentes a las drogas convencionales sintéticas, las cuales presentan múltiples efectos secundarios.

En el presente estudio se buscó determinar si el extracto etanólico de las hojas de *Thymus vulgaris* presenta actividad ansiolítica en *Rattus norvegicus* por medio del uso del Laberinto en Cruz Elevado, de ser así, compararlo con la actividad ansiolítica que ejerce el clonazepam.

En la **Tabla 01** analizamos las medias del tiempo y el número de entradas en los brazos abiertos y cerrados de cada grupo incluyendo al grupo 5 (clonazepam 0,25mg/kg) como resultado se muestra un valor p de 0,012 y 0,035 en las medias del número de entradas en los brazos abiertos y cerrados respectivamente, al mostrar por tanto significancia estadística aparentemente se anularía la hipótesis nula y se aceptaría la hipótesis alternativa, posteriormente, para determinar que grupos fueron los que hicieron esa diferencia estadística, se observó, por medio de la prueba de Tukey, que fueron el grupo 3 y el grupo 5.

Por esta razón se decidió hacer otra prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) pero esta vez sin el grupo 5, los resultados de esta prueba se encuentran en la **Tabla 02**, mostrando todas las medias un valor  $p > 0,05$ . Lo cual indica finalmente que si bien el extracto etanólico de las hojas de *Thymus vulgaris* sí muestra actividad ansiolítica al mostrar un mayor número de entradas en los brazos abiertos comparando los dos

primeros grupos que recibieron *Thymus vulgaris* con el grupo que recibió placebo, dicha actividad no es estadísticamente significativa.

Dicho resultado contradice lo que refiere **Alireza Komaki. et al**, quien hizo un estudio experimental en el año 2014 en Irán, demostrando por medio del laberinto elevado en cruz (LEC) que el consumo de extracto de *Thymus vulgaris* a dosis de 50 mg/kg, 100 mg/kg y 200 mg/kg administrado por 7 días, disminuía proporcionalmente la ansiedad en ratas de laboratorio, sin influenciar en su actividad locomotora (25)

Además no apoya la información del estudio realizado por **Flavia Negromonte. et al**, en el año 2011, quienes observaron que al hacer inhalar óxido de linalool, compuesto que se encuentran en algunas plantas aromáticas como el *Thymus vulgaris*, a un grupo de ratones macho, éste se comportaba como un agente ansiolítico, siendo comprobado por medio del laberinto en cruz elevado y la prueba de la caja con luz y oscuridad. (3)

De nuestra investigación inferimos que el extracto etanólico de las hojas de *Thymus vulgaris* administrado a 50mg/kg, 100mg/kg y 200mg/kg no ejerce un efecto ansiolítico estadísticamente significativo sobre los especímenes de *Rattus norvegicus*  $p > 0,05$ .

Así mismo se observa en nuestro estudio que el extracto etanólico de las hojas de *Thymus vulgaris* administrado a 200mg/kg muestra un “efecto paradójico” al mostrar un menor número de entradas en el brazo abierto comparado con el grupo placebo; a su vez este fue el grupo que mostró mayor cantidad de fallecimientos durante el estudio (50% del total en el grupo).

Por otro lado el clonazepam administrado a una dosis de 0,25mg/kg si muestra actividad ansiolítica estadísticamente significativa con un valor p de 0,012.

Una limitación del estudio es que no se pudo realizar el proceso de liofilización del extracto etanólico de las hojas de *Thymus vulgaris* por limitaciones de disponibilidad del equipo. Otra limitación del estudio fue que durante el periodo de adaptación y administración de medicamentos fallecieron 13 ratas y enfermó una, disminuyendo así el tamaño de la muestra al momento del inicio de la fase experimental, hecho que pudo modificar el resultado final de estudio; además durante la fase experimental no se pudo garantizar iguales condiciones de luminosidad y temperatura para cada rata dado que solo se disponía de un Laverinto en Cruz Elevado y el proceso de filmación y limpieza de residuos duró aproximadamente en total nueve horas.

De los 13 especímenes que fallecieron, cinco pertenecieron al grupo que recibió *Thymus vulgaris* a una dosis de 200mg/kg, siendo este, el grupo con mayor número de muertes, es probable, por tanto, que se haya encontrado una dosis tóxica para el espécimen. Albo G. et al, describen que los aceites esenciales presentan una dosis media letal (DL 50) que varía de acuerdo al tipo de aceite, así mismo demostraron que el *Thymus vulgaris* es virtualmente no toxica para las abejas y altamente tóxica para las larvas. (32)



Por otro lado, no fue posible comparar la actividad ansiolítica del clonazepam con el extracto etanólico de las hojas de *Thymus vulgaris* ya que este último no mostró relevancia estadística.

Para finalizar, en esta investigación se ha demostrado que el extracto etanólico de las hojas de *Thymus vulgaris* sí presentan actividad ansiolítica, evidenciada al mostrar un mayor número de entradas en los brazos abiertos del Laberinto en Cruz Elevado por parte de los grupos que recibieron 50mg/kg y 100mg/kg comparado con el grupo placebo, sin embargo dicha actividad ansiolítica no es estadísticamente significativa. Dichos resultados contradicen otros estudios previos quienes sí reportan dicha actividad como significativa.

## V. CONCLUSIONES

- 1.- El extracto etanólico de las hojas del *Thymus vulgaris* no presenta efecto ansiolítico estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ).
- 2.- El efecto ansiolítico de las hojas del extracto etanólico del *Thymus vulgaris* no es directamente proporcional a su dosis de administración.

## VI. RECOMENDACIONES

- 1.- Dado que el timol, aceite esencial encontrado en el *Thymus vulgaris*, tiene efecto similar a la acción de GABA demostrado según el estudio de **Ranil Waliwitiya. et al**, (2010) y el linalool tiene un efecto ansiolítico demostrado por el estudio de **Flavia Negromonte. et al**, (2011), se recomienda comprobar la existencia de dichos principios activos en la planta *Thymus vulgaris* de nuestra localidad y obtener los aceites esenciales de una manera diferente, por ejemplo, por medio del arrastre de vapor. (3) (26)
- 2.- Se recomienda también, debido a la muerte del 50% de los especímenes del grupo que recibió *Thymus vulgaris* a 200mg/kg, indagar posibles efectos tóxicos presentes en los aceites esenciales de dicha planta en ratas de laboratorio, realizando dosajes de transaminasas para evaluar la función hepática y en caso de fallecimiento del espécimen, realizar biopsia hepática para su posterior estudio.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Komaki A, Khaledi Nasab Z, Shahidi S, Sarihi A, Salehi I, Ghaderi A. Anxiolytic Effects of Acute Injection of Hydro-Alcoholic Extract of Lettuce in the Elevated Plus-Maze Task in Rats. *Avicenna J Neuro Psych Physiol* [Internet]. 25 de agosto de 2014 [citado 29 de agosto de 2016];1(1). Disponible en: [http://www.avicennajnpp.com/?page=article&article\\_id=18695](http://www.avicennajnpp.com/?page=article&article_id=18695)
2. Horváth A, Montana X, Lanquart J-P, Hubain P, Szűcs A, Linkowski P, et al. Effects of state and trait anxiety on sleep structure: A polysomnographic study in 1083 subjects. *Psychiatry Res*. 30 de octubre de 2016;244:279-83.
3. Souto-Maior FN, Carvalho FL de, Morais LCSL de, Netto SM, de Sousa DP, Almeida RN de. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. *Pharmacol Biochem Behav*. Diciembre de 2011;100(2):259-63.
4. Definiciones operacionales y criterios de programación y de medición de avance de los programas presupuestales. Programa presupuestal 0131 control y prevención en salud mental, Anexo 2. Ministerio de Salud. Perú. 2016; 4- 11
5. Gerencia de prestaciones de salud. Informe de producción de los servicios de medicina complementaria, año 2015. Perú.2015; 1-4.
6. Perales A, Chue H, Padilla A, Barahona L. Estrés, ansiedad y depresión en magistrados de Lima, Perú. *Rev. peru. med. exp. Salud pública*. 2011, vol.28, 4
7. Sánchez C, Chichón J, León F, Alipazaga P, Trastornos mentales en estudiantes de medicina humana en tres universidades de Lambayeque, Perú. *Rev Neuropsiquiatr* 2016; 79 (4). 197-206.

8. Piazza M, Fiestas F. Prevalencia anual de trastornos y uso de servicios de salud mental en el Perú: Resultados del estudio mundial de salud mental, 2005. *Rev. peru. med. exp. Salud pública* [online]. 2014, vol.31, 1
9. Laurence L. Brunton. Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12<sup>a</sup> Edición. Mc Graw Hill; 2012. 413p.
10. Hossain MA, AL-Raqmi KAS, AL-Mijizy ZH, Weli AM, Al-Riyami Q. Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pac J Trop Biomed*. 1 de septiembre de 2013;3(9):705-10.
11. Dogu-Baykut E, Gunes G, Decker EA. Impact of shortwave ultraviolet (UV-C) radiation on the antioxidant activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Food Chem*. Agosto de 2014;157:167-73.
12. Ahmad A, van Vuuren S, Viljoen A. Unravelling the Complex Antimicrobial Interactions of Essential Oils — The Case of *Thymus vulgaris* (Thyme). *Molecules*. 6 de marzo de 2014;19(3):2896-910.
13. Dawidowicz AL, Rado E, Wianowska D, Mardarowicz M, Gawdzik J. Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. *Talanta*. Agosto de 2008;76(4):878-84.
14. El-Nekeety AA, Mohamed SR, Hathout AS, Hassan NS, Aly SE, Abdel-Wahhab MA. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. *Toxicol*. junio de 2011;57(7–8):984-91.

15. Castro D, Diaz J, Serna R, Martinez M, Urrea P, Muñoz K, Osorio E. Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales. Universidad Católica de Oriente. Colombia. 2 edición 2013; 40-42
16. Laurent Cécile. Situación de la agricultura orgánica en la región de Arequipa – Perú. El Taller, asociación de promoción y desarrollo, Louvain cooperation. 2016. 10-35
17. Fachini-Queiroz FC, Kummer R, Estevão-Silva CF, Carvalho MD de B, Cunha JM, et al. Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. *Evid Based Complement Alternat Med*. 5 de julio de 2012;2012:e657026.
18. Zaborowska Z., Przygoński K., Biliska A., 2012. Antioxidative effect of thyme (*Thymus vulgaris*) in sunflower oil. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*. 2012(3), 283-291.
19. Ündeğer Ü, Başaran A, Degen GH, Başaran N. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food Chem Toxicol*. Agosto de 2009; 47(8):2037-43.
20. Cerda A, Martínez ME, Soto C, Poirrier P, Perez-Correa JR, Vergara-Salinas JR, et al. The enhancement of antioxidant compounds extracted from *Thymus vulgaris* using enzymes and the effect of extracting solvent. *Food Chem*. Agosto de 2013;139(1–4):138-43.
21. Paredo H, Palou E, López A. Aceites esenciales: métodos de extracción. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos. Departamento de Ingeniería Química y

Alimentos, Universidad de las Américas Puebla San Andrés Cholula. México 2009:24-32.

22. Yáñez G, Velasteguí J. Investigación de la actividad antimicrobiana y fitoquímica de extractos de plantas medicinales frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Cándida albicans*. *Facultad de Ciencia e Ingeniería en alimentos, Universidad Técnica de Ambato. Ecuador 2014: 7-10.*

23. Rosell Cáseres Gabriel. Determinación del contenido total de polifenoles-flavonoides y actividades antioxidantes y antibacteriana in vitro del extracto etanólico al 70% de *Thymus vulgaris* L. "tomillo" frente a *Staphylococcus aureus* CEPA ATCC 25923. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Perú 2014: 1-2.

24. Nin M, Couto N, Marilise F, Azered L, Ferri M, Dalprá W, Gomez R, Barros H. Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: Grooming microstructure and elevated plus maze tests. *European Journal of Pharmacology*. 2012; 95-101

25. Komaki A, Hoseini F, Shahidi S, Baharlouei N. Study of the effect of extract of *Thymus vulgaris* on anxiety in male rats. *J Tradit Complement Med*. julio de 2016;6(3):257-61.

26. Waliwitiya R, Belton P, Nicholson RA, Lowenberger CA. Effects of the essential oil constituent thymol and other neuroactive chemicals on flight motor activity and wing beat frequency in the blowfly *Phaenicia sericata*. *Pest Manag Sci*. 1 de marzo de 2010;66(3):277-89.

27. Sharp P, Villano J. *The laboratory Rat Second Edition. A Volume in the Laboratory Animal Pocket Reference Series*. 2012; 16-50.

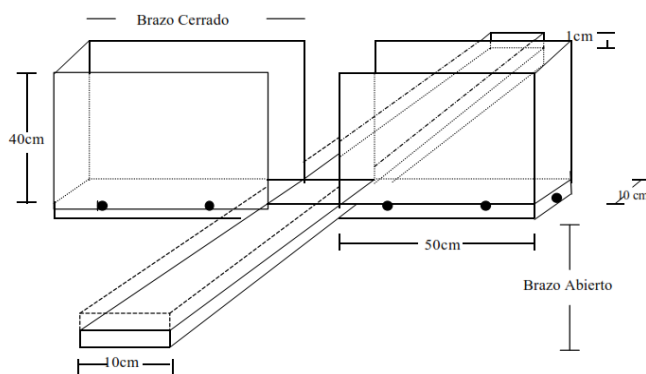
28. John Hopkins University [homepage on the internet] Baltimore Maryland 2015 Animal Care and Use Program. [Updated January 2015]. Available from: <http://web.jhu.edu/animalcare/procedures/rat.html>
29. Fuentes F, Mendoza R, Rosales A, Cisneros R. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Lima 2008; 9-54.
30. García J, Reding A, López J. Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. Departamento de Bioestadística y Bioinformática. México 2013; 218-223.
31. Arévalo C, Astahuamán D, Lescano R. Gerencia Central de Prestaciones de Salud. Gerencia de Medicina Complementaria. Informe de producción de las Farmacias de Medicina Complementaria año 2016. Perú. 2017
32. Albo G, Henning C, Reynaldi F, Ringuelet J, Cerimele E. Dosis Letal Media (DL50) de algunos aceites esenciales y biocidas efectivos para el control de *Ascosphaera apis* en *Apis mellifera* L. Revista electrónica de Veterinaria. 2010; 11: 9-12.

## VIII. ANEXOS

### 8.1 Administración respectiva para cada grupo.

Grupo	Elemento a administrar	Dosis Diaria
Experimental 1	Extracto etanólico de Thymus vulgaris	50mg/Kg vía Oral complementando con agua estéril hasta 4.6ml
Experimental 2	Extracto etanólico de Thymus vulgaris	100 mg/kg vía Oral complementando con agua estéril hasta 4.6ml
Experimental 3	Extracto etanólico de Thymus vulgaris	200mg/kg vía Oral complementando con agua estéril hasta 4.6ml
Control 1	Agua Estéril	4.6ml vía Oral
Control 2	Clonazepam	0.25mg/kg vía Oral complementando con agua estéril hasta 4.6ml

### 8.2 Laberinto en Cruz Elevado





### 8.3 Laberinto en Cruz Elevado en Físico



### 8.4 Planta *Thymus vulgaris* traída de la ciudad de Arequipa



### 8.5 *Thymus vulgaris* secando sobre papel Kraft a 22°C de Temperatura



### 8.6 Estufa donde se terminó secar la planta *Thymus vulgaris* por 24 horas



### 8.7 Trituración de la planta con el Tamiz de 850 micras



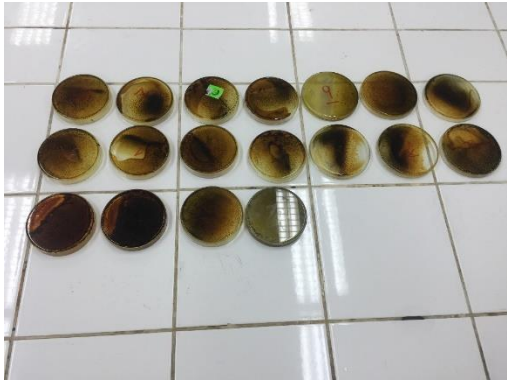
### 8.8 Extracción Etanólica de la planta *Thymus vulgaris* (Sala de preparados de la Farmacia Natural de Medicina Complementaria de EsSALUD)



### 8.9 Evaporación del Extracto Etanólico de *Thymus vulgaris* por medio del Rota-Vapor



### 8.10 Proceso de Secado y Raspado del Extracto Etanólico en Placas Petri



### 8.11 Redosificación de la planta *Thymus vulgaris*



### 8.12 Redosificación de 2 tabletas de Clonazepam de 2mg c/u



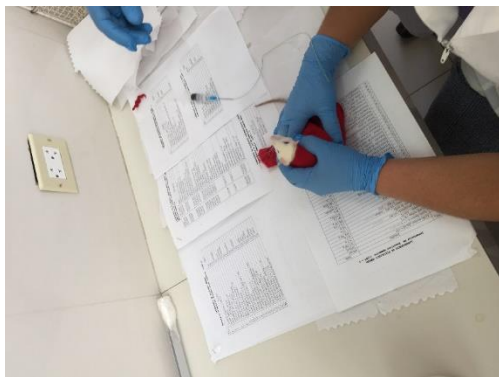
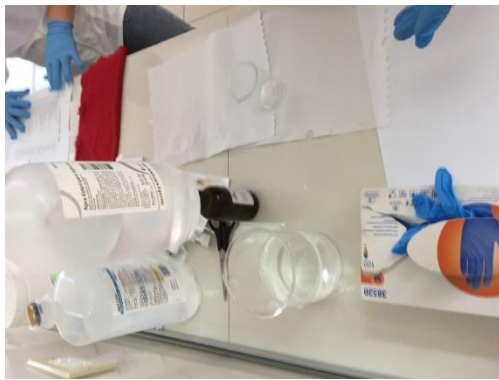
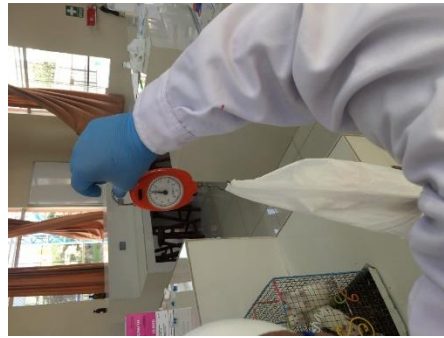
### 8.13 Adquisición de las 50 ratas de laboratorio



### 8.14 Traslado a Laboratorio de la UPAO Trujillo-Perú



### 8.15 Administración de los respectivas sustancias a las ratas Wistar



### 8.16 Fallecimiento de 13 Ratas durante el Estudio



## 8.17 Constancia de Autenticidad del *Thymus vulgaris*

 **UPAO** | Museo de Historia Natural y Cultural

**HERBARIO ANTONOR ORREGO (HAO)**

CONSTANCIA N° 22-2018-HAO-UPAO

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

**CONSTANCIA**

Que **Sergio Adrián Morales Vergara**, 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:

***Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae)**

El mismo que será utilizado para la tesis titulada: "Actividad ansiolítica del extracto de las hojas de *Thymus vulgaris* (tomillo) en *Rattus norvegicus*". La muestra ha sido signada con el código HAO n° 20039.

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

Trujillo, 11 de junio de 2018

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

---

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONOR ORREGO  
www.upao.edu.pe

Avenida Sur 2102 Matucana Trujillo - Perú  
Tel: (+51) 075 608444 Fax: 707500

## 8.18 Certificado Sanitario de *Rattus Norvegicus*

UNIVERSIDAD LOS ÁNGELES DE CHIMBOTÉ LABORATORIO DE BIOQUÍMICA - FARMACOLOGÍA COORDINACIÓN DE BIOTERIO	
 <b>CERTIFICADO SANITARIO N° 05-2018</b>	
Producto : Rata Albina	Cantada : 6 - 2018
Especie : <i>Rattus norvegicus</i>	Cantidad : 50
Cepa : Holtzman	Edad : 2 meses a 3 meses
Peso : 150 - 160 g	Sexo : Hembras (50)
	Destino : Universidad Privada Antenor Orrego Trujillo
Chimbote : 07-07-2018	
El Jefe de Laboratorio Bioquímica / Farmacología - BIOTERIO, que suscribe, Mg. Q.F Liz Zevallos Escobar, Coordinador de Bioterio Certifica que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias*.	
*Referencia: INSTITUTO NACIONAL DE SALUD.	
Chimbote, 07 de julio del 2018 (Fecha de emisión del certificado)	 Mg. Q.F. Liz Zevallos Escobar COP 11378 Vice de Laboratorio Bioquímica y Farmacología
Nota: El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.	..... Mg. Q.F Liz Zevallos Escobar CQFP: 11378