



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DEL
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE ESPINACA**
(*Spinacia oleracea*) EN RATONES (*Mus musculus*)

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR:

JOSÉ LUIS GUZMÁN GUAÑO

Riobamba – Ecuador

2024



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DEL
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE ESPINACA**
(*Spinacia oleracea*) EN RATONES (*Mus musculus*)

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: JOSÉ LUIS GUZMÁN GUAÑO

DIRECTORA: BQF. AIDA ADRIANA MIRANDA BARROS

Riobamba – Ecuador

2024

© 2023, José Luis Guzmán Guaño

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, José Luis Guzmán Guaño, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 06 de marzo de 2024

A handwritten signature in blue ink, reading "José Luis Guzmán Guaño". The signature is written in a cursive style with a large initial 'J' and 'G'.

José Luis Guzmán Guaño

060496977-4

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Trabajo Experimental, **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE ESPINACA (*Spinacia oleracea*) EN RATONES (*Mus musculus*)** realizado por el señor: **JOSÉ LUIS GUZMÁN GUAÑO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Bqf. Diego Renato Vinuesa Tapia PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2024-05-23
Bqf. Aída Adriana Miranda Barros DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2024-05-23
Bqf. Gisela Alexandra Pilco Bonilla ASESORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2024-05-23

DEDICATORIA

Dedico este trabajo, estos años y este crecimiento a Dios, mi madre y mi hermano.

José

AGRADECIMIENTO

Agradezco a todos quienes contribuyeron para que este trabajo se desarrollara de la manera más adecuada, docentes, técnicos de laboratorio, instituciones y demás personas quienes, de forma directa o implícita, fueron parte vital del proceso.

José

ÍNDICE DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN.....	xii
SUMMARY / ABSTRACT	xiii

CAPÍTULO I

1.	DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA.....	1
1.1.	Planteamiento del problema.....	1
1.2.	Justificación	1
1.3.	Objetivos	3
1.3.1.	<i>Objetivo principal</i>	3
1.3.2.	<i>Objetivos específicos</i>	3

CAPÍTULO II

2.	MARCO TEÓRICO	4
2.1.	Marco Referencial.....	4
2.1.1.	<i>Ansiedad</i>	4
2.1.2.	<i>Fisiopatología de la ansiedad</i>	5
2.1.3.	<i>Datos estadísticos de ansiedad</i>	6
2.1.4.	<i>Trastorno de ansiedad</i>	7
2.1.4.1.	<i>Trastorno de ansiedad generalizada</i>	7
2.1.4.2.	Trastorno de pánico.....	7
2.1.4.3.	Trastorno de ansiedad social	8
2.1.5.	<i>Fobia específica</i>	9
2.1.6.	<i>Tratamiento de la ansiedad</i>	9
2.1.6.1.	<i>Tratamiento no farmacológico</i>	9
2.1.6.2.	<i>Tratamiento farmacológico</i>	10

2.1.7.	<i>Fitoterapia para la ansiedad</i>	12
2.1.8.	<i>Espinaca (Spinacia oleracea)</i>	13
2.1.8.1.	<i>Descripción de la planta</i>	13
2.1.8.2.	<i>Habitat y distribución</i>	13
2.1.8.3.	<i>Propiedades nutracéuticas</i>	14
2.1.8.4.	<i>Estudios ansiolíticos realizados</i>	14
2.1.9.	<i>Modelos animales para el estudio de la ansiedad</i>	14
2.1.9.1.	<i>Pruebas condicionadas</i>	15
2.1.9.2.	<i>Pruebas no condicionadas</i>	15

CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	17
3.1.	Lugar de investigación	17
3.2.	Recolección del material vegetal	17
3.3.	Materiales, equipos y reactivos	17
3.3.1.	<i>Material vegetal</i>	17
3.3.2.	<i>Material biológico</i>	17
3.3.3.	<i>Materiales de laboratorio, equipos y reactivos</i>	18
3.3.4.	<i>Control de calidad de la planta seca</i>	20
3.3.4.1.	<i>Determinación de Humedad</i>	20
3.3.4.2.	<i>Determinación de Cenizas totales</i>	20
3.3.4.3.	<i>Cenizas insolubles en HCL</i>	21
3.3.4.4.	<i>Cenizas solubles en agua</i>	21
3.3.5.	<i>Screening fotoquímico</i>	22
3.3.6.	<i>Preparación de los extractos</i>	22
3.3.7.	<i>Preparación del extracto hidroalcohólico</i>	25
3.3.7.1.	<i>Control de calidad del extracto hidroalcohólico</i>	25
3.3.7.1.1.	<i>Requisitos organolépticos</i>	25
3.3.7.1.2.	<i>Índice de refracción</i>	25

3.3.7.1.3.	<i>Determinación de pH</i>	26
3.3.7.1.4.	<i>Densidad relativa</i>	26
3.3.7.1.5.	<i>Sólidos totales</i>	26
3.3.8.	<i>Determinación de fenoles totales</i>	27
3.3.9.	<i>Determinación de flavonoides totales</i>	27
3.4.	Actividad ansiolítica	28
3.4.1.	<i>Equipo electrónico Laberinto en Cruz Elevado</i>	28
3.4.2.	<i>Equipo Plataforma agujereada</i>	29
3.5.	Análisis estadístico	29

CAPÍTULO IV

4.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	31
4.1.	Control de calidad de la droga cruda	31
4.2.	Tamizaje Fitoquímico	32
4.3.	Control de calidad extracto hidroalcohólico	34
4.4.	Cuantificación de fenoles y flavonoides del extracto hidroalcohólico de hojas de espinaca	35
4.5.	Evaluación de la actividad ansiolítica	37
4.5.1.	<i>Equipo de medición "Plataforma agujereada"</i>	37
4.5.1.1.	<i>Evaluación de control</i>	37
4.5.1.2.	<i>Efecto de Spinacia oleracea sobre actividad ansiolítica en Plataforma Agujereada</i>	38
4.5.2.	<i>Efecto de Spinacia oleracea sobre actividad ansiolítica en Laberinto en Cruz elevado</i>	42

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1.	Diferencia entre ansiedad fisiológica y patológica	4
Tabla 3-2.	Lista de materiales, equipos y reactivos utilizados en la investigación	18
Tabla 4-3.	Resultados del control de calidad de hojas secas de <i>Spinacia oleracea</i>	31
Tabla 4-4.	Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etéreo, alcohólico y acuoso...	32
Tabla 4-5.	Control de calidad del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Spinacia oleracea</i> ...	34
Tabla 4-6.	Cuantificación de la concentración de fenoles y flavonoides de <i>Spinacia oleracea</i>	35
Tabla 4-7.	Resultados de la primera evaluación de control de la plataforma agujereada ...	37
Tabla 4-8.	Resultados de la segunda evaluación de control de la plataforma agujereada...	37
Tabla 4-9.	Número de hundimientos de los ratones ante los tratamientos aplicados.....	38
Tabla 4-10.	Prueba ANOVA de cada tratamiento realizado en la prueba de plataforma agujereada.....	40
Tabla 4-11.	Prueba Post Hoc de Tuckey de cada tratamiento realizado en la prueba de plataforma agujereada.	40
Tabla 4-12.	Número de entradas en brazos abiertos y brazos cerrados.....	42
Tabla 4-13.	Tiempo de entradas en brazos abiertos y brazos cerrados.	43
Tabla 4-14.	Prueba ANOVA de cada tratamiento realizado en la prueba de brazos abiertos y cerrados.	44
Tabla 4-15.	Prueba Post Hoc de Tuckey de cada tratamiento realizado en la prueba de brazos abiertos	44

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1. Mecanismos de transmisión GABA.....	5
Ilustración 2- 2. Espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>).....	13
Ilustración 3-3. Esquema de la elaboración del Tamizaje Fotoquímico.....	23
Ilustración 3-4. Esquema de ensayos del extracto etéreo para el Tamizaje Fotoquímico	24
Ilustración 3-5. Esquema de ensayos del extracto alcohólico para el Tamizaje Fitoquímico. ..	24
Ilustración 3- 6. Esquema de ensayos del extracto acuoso para el Tamizaje Fotoquímico	25
Ilustración 3-7. Equipo de medición "Laberinto en cruz elevado"	28
Ilustración 3-8. Equipo de medición "Plataforma agujereada"	29
Ilustración 4-9. número de entradas y tiempo transcurrido de <i>Mus musculus</i> en brazos abiertos en laberinto de cruz elevado.	46

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: CONTROL DE CALIDAD DE LA HOJA SECA DE *Spinacia oleracea*.

ANEXO B: TAMIZAJE FITOQUÍMICO

ANEXO C: CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE
Spinacia oleracea

ANEXO D: CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO

ANEXO E: CUANTIFICACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES

ANEXO F: PREPARACIÓN DEL EXTRACTO SECO DE *Spinacia oleracea*

ANEXO G: ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

ANEXO H: COMPORTAMIENTO DEL RATON (*Mus musculus*) EN LA PLATAFORMA
AGUJERADA

RESUMEN

La ansiedad, según informes presentados por la OMS ha emergido como una patología de impacto significativo en la última década a nivel mundial, adquiriendo una importante relevancia tras el periodo de confinamiento provocado por la pandemia de COVID-19, por tal razón, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad ansiolítica del extracto hidroalcohólico de hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) en ratones (*Mus musculus*) en tres distintas concentraciones (100 mg/kg, 200 mg/kg y 300 mg/Kg), para lo cual se identificaron flavonoides y fenoles cualitativamente y cuantitativamente mediante tamízame fitoquímico y métodos colorimétricos (Folin - Ciocalteu y el AlCl₃) respectivamente; después, se comprobó la actividad ansiolítica mediante el uso del equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado y el equipo de medición plataforma agujereada.

Se identificó la presencia de fenoles y flavonoides en los ensayos de cloruro férrico y Shinoda del extracto acuoso y alcohólico de *Spinacia oleracea*. La concentración de fenoles y flavonoides totales se estableció en $15,74 \pm 0,29$ mg EAG/g PS y $18,77 \pm 0,312$ mg EQ/g PS respectivamente. En cuanto a la evaluación de la actividad ansiolítica, se evidenció una dependencia de la dosis del extracto, donde la concentración máxima de 300 mg/kg redujo la ansiedad en los ratones casi al mismo nivel que el control positivo (clonazepam) tanto en la evaluación de hundimientos de cabeza en la plataforma, como en el número de entradas y tiempo de permanencia en brazos abiertos y cerrados en el laberinto en cruz elevado.

En ese contexto, se concluye que la *Spinacia oleracea* posee actividad ansiolítica a una dosis de 300 mg/kg en ejemplares *Mus musculus*, es así que se recomienda realizar un análisis de toxicidad de *Spinacia oleracea* para poder recolectar información de los riesgos que pueda ocasionar la administración prolongada del extracto a la dosis efectiva.

Palabras clave: < ACTIVIDAD ANSIOLÍTICA>, <ESPINACA (*Spinacia oleracea*) >, <RATONES (*Mus musculus*)>, <PLATAFORMA AGUJEREADA>, <LABERINTO EN CRUZ ELEVADA>

0645-DBRA-UPT-2024



SUMMARY / ABSTRACT

The main objective of this research study was to focus on Anxiety that according to reports presented by the WHO, has emerged as a pathology of significant impact in the last decade worldwide, acquiring an important relevance after the period of confinement caused by the COVID-19 pandemic. For this reason, the objective was to evaluate the anxiolytic activity of the hydroalcoholic extract of spinach leaves (*Spinacia oleracea*) in mice (*Mus musculus*) at three different concentrations (100 mg/kg, 200 mg/kg and 300 mg/kg), for which flavonoids and phenols were identified qualitatively and quantitatively by phytochemical screening and colorimetric methods (Folin - Ciocalteu and AlCl₃) respectively; then, the anxiolytic activity was tested by using the electronic elevated cross maze measuring equipment and the needle platform measuring equipment. The presence of phenols and flavonoids was identified in the ferric chloride and Shinoda assays of the aqueous and alcoholic extract of *Spinacia oleracea*. The concentration of total phenols and flavonoids was established at 15.74 ± 0.29 mg EAG/g PS and 18.77 ± 0.312 mg EQ/g PS, respectively. Regarding the evaluation of anxiolytic activity, a dose dependence of the extract was evidenced, where the maximum concentration of 300 mg/kg reduced anxiety in mice almost at the same level as the positive control (clonazepam) both in the evaluation of head sinking on the platform, as well as in the number of entries and time spent in open and closed arms in the elevated cross maze. In this context, it is concluded that *Spinacia oleracea* has anxiolytic activity at a dose of 300 mg/kg in *Mus musculus* specimens, thus it is recommended to perform a toxicity analysis of *Spinacia oleracea* in order to collect information on the risks that may be caused by prolonged administration of the extract at the effective dose.

Keywords: <ANISOLITIC ACTIVITY>, <SPINACA (*Spinacia oleracea*) >, <MICE (*Mus musculus*)>, <PLATOPHOREAL PLATFORM>, <LABERINTE IN ELEVATED CROSS>, <LABERINTE IN ELEVATED CROSS>, <LABERINTE IN ELEVATED CROSS>.



Mgs. Evelyn Carolina Macias Silva

C.I 0603239070

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

La Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA) a través del Centro Nacional de Farmacovigilancia, indicó que el consumo inadecuado, sin supervisión médica e irresponsable de fármacos con propiedades ansiolíticas como clonazepam, tiene efectos secundarios que van desde la somnolencia, mareos y náuseas hasta pérdida de equilibrio, problemas de coordinación, dificultad para pensar o recordar, dolor de cabeza, muscular o de articulaciones; visión borrosa, temblores, incontinencia o retención urinaria e incremento de saliva (ARCSA, 2023).

Por cuestiones de la reciente situación global por COVID-19, no se dispone de datos estadísticos concretos sobre el mal uso de estos medicamentos. Sin embargo, se ha evidenciado un aumento en su consumo en diversos centros hospitalarios (Guzman Villa & Rodriguez Vinueza, 2022, p.11). Esta tendencia podría mencionar un incremento en la sobredependencia de tales medicamentos, resaltando la necesidad de realizar monitorización hospitalaria a su uso y explorar alternativas de tratamiento a esta patología.

Por tanto, el propósito central de esta investigación es identificar alternativas complementarias eficaces para el tratamiento de la ansiedad y la depresión. De esta manera, se busca disminuir el periodo de uso de ansiolíticos convencionales, cuya administración prolongada puede derivar en serias complicaciones como problemas respiratorios o sedación intensa. Además, cabe destacar que la combinación de ansiolíticos con ciertos medicamentos puede provocar depresión del centro respiratorio, coma, y en casos extremos, la muerte (Dubovsky & Marshall, 2022, p.4). La investigación se orienta, por tanto, a ofrecer opciones más seguras y con menores efectos adversos para los pacientes.

1.2 Justificación

La espinaca es una planta herbácea común y fácilmente accesible que contiene en su composición varios compuestos bioactivos que indican propiedades ansiolíticas potenciales (Monu Yadav, et al. 2018, p.11). Por lo tanto, el estudio de la actividad ansiolítica del extracto de sus hojas puede ser una forma efectiva de aprovechar estos compuestos y realizar ensayos para el tratamiento de la

ansiedad, siendo a su vez, beneficioso para la población en términos de accesibilidad y costo debido a la facilidad de cultivar la planta de espinaca y de encontrarla en la mayoría de las tiendas de comestibles y mercados locales.

La medicina tradicional, que utiliza plantas y sustancias de origen vegetal, ha evidenciado resultados positivos en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades. Esta práctica ha evolucionado hacia técnicas más avanzadas, como la fitoterapia y ha demostrado eficacia en la sanación energética, siendo aplicada en situaciones donde la medicina convencional muestra limitaciones. Además, en varios contextos, ha evolucionado para ser considerada como medicina alternativa (Bahense et al., 2017, p.21; Bailon-Moscoso et al., 2015, p.2).

Ecuador es uno de los países más ricos en flora por la variedad significativa de especies de origen vegetal, pues existen gran variedad de bosques de tipo tropical, selvas, páramos y desiertos con más de 2.000 especies vegetales como la espinaca (*Spinacia oleracea*) (Huaraca Salazar, 2015, p.4). Sin embargo, existen pocas investigaciones que comprueben las actividades biológicas que estas poseen gracias a sus metabolitos, por lo que es importante investigar estos compuestos sobre todo aquellas con usos ancestrales, con el fin de que puedan ser estudiadas y pueden formar parte del desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento de todo tipo de enfermedades.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo directo beneficiar de aquellos individuos que cursan cuadros de ansiedad y estrés no tratados o tratados de forma insuficiente con medicamentos sintéticos convencionales. De manera implícita, se busca contribuir al conocimiento existente sobre la espinaca (*Spinacia oleracea*), proporcionando una base de datos que la comunidad científica pueda utilizar como referencia en investigaciones futuras en las que se usen equipos más sofisticados.

El empleo de modelos de ansiedad en ratones presenta la ventaja de poder realizar ensayos con diversas técnicas experimentales que serían impracticables en seres humanos. Al explorar extractos y alcaloides (sustancias en estudio) extraídos de diversos órganos de las plantas, estas sustancias suelen obtenerse en cantidades reducidas. El uso de ratones permite una utilización óptima de este recurso, facilitando la obtención de resultados válidos en la investigación (Yunta, 2007, p.7) .

La evaluación de la potencial actividad ansiolítica del extracto de hojas de espinaca se presenta como una investigación factible y pertinente, esto debido a que existen investigaciones anteriores

que mencionan la presencia de compuestos bioactivos en esta planta, los mismos que han mostrado propiedades ansiolíticas. Además, las instalaciones de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) están equipadas para llevar a cabo este estudio, con laboratorios, equipos e instrumentos necesarios para los análisis requeridos, así como un bioterio debidamente acondicionado. Estos recursos proporcionan un entorno adecuado para la poder realizar investigaciones de esta naturaleza.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo principal

Evaluar la actividad ansiolítica del extracto hidroalcohólico de hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) en ratones (*Mus musculus*)

1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar la presencia de fenoles y flavonoides en las muestras de hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) mediante tamizaje fotoquímico.
- Determinar la cantidad de flavonoides y fenoles presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) a través de métodos colorimétricos.
- Comprobar la actividad ansiolítica del extracto hidroalcohólico de hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) mediante el uso del equipo electrónico de medición laberinto en cruz elevado y el equipo de medición plataforma agujereada

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Marco Referencial

2.1.1 Ansiedad

El manual estadístico y diagnóstico de trastornos mentales establece que la ansiedad, está definida como un estado de anticipación aprensiva frente a un posible problema o acontecimiento no deseado a futuro, acompañada de un sentimiento de desesperación o de sintomatología física de estrés (Pichot et al., 1995, p.402). El objetivo del daño anticipado puede ser interno o externo distinguiendo su sintomatología a cuatro niveles:

- Motor: tensión muscular, temblor, etc.
- Cognitivo: irritabilidad, agobio, miedo, insomnio, etc.
- Conductual: huida o evitación ante situaciones determinadas.
- Vegetativo: náuseas, sudoración palpitaciones, sequedad de boca, etc.

A pesar de que la ansiedad se destaca por su estrecha relación al miedo, se diferencia a este último debido a que estar en un estado de alerta es una condición que se manifiesta ante situaciones específicas establecidos en el momento, el estado de ansiedad en consecuencia, tiene relación directa con la prevención de peligros que se puedan presentar a futuro (Hamati, 2018, p.12).

Es de suma importancia tomar en cuenta de que la ansiedad puede ser tomado en cuenta como un sentimiento común ante ciertas situaciones del día a día (ansiedad fisiológica), y, este solo llega a superar ciertos límites tanto fisiológicos como anatómicos cuando llega a ser de tipo patológica. A continuación, se presenta un cuadro comparativo de las diferencias más notorias:

Tabla 2-1. Diferencia entre ansiedad fisiológica y patológica

<i>Ansiedad de tipo Fisiológica</i>	<i>Ansiedad de tipo Patológica</i>
<ul style="list-style-type: none">• Reactiva a una circunstancia ambiental.	<ul style="list-style-type: none">• Puede bloquear una respuesta adecuada a la vida diaria.

<ul style="list-style-type: none"> • Función adaptativa. • Mejora nuestro rendimiento. • Su desarrollo es más leve. • Menor componente somático. • No requiere demanda de atención psiquiátrica. 	<ul style="list-style-type: none"> • Desproporcionada al desencadenarse. • Función desadaptativa. • Empeora el rendimiento. • Su desarrollo es más grave. • Mayor componente somático. • Requiere demanda de atención psiquiátrica.
---	---

Fuente: cuadro adaptado del artículo de Orozco et al., 2012, p.14.

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

2.1.2 Fisiopatología de la ansiedad

El ácido g-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC y cumple un papel fundamental en la modulación de la actividad neuronal. El GABA actúa como mediador a través de 2 tipos de receptores, los ionotrópicos GABA-A y GABA-C, y los metabotrópicos GABA-B (Benarroch et al., 2012, p.3).

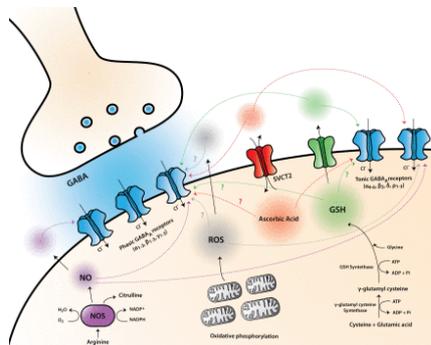


Ilustración 2-1. Mecanismos de transmisión GABA

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

El receptor de GABA_A, es el que se encuentra más ampliamente distribuido en el sistema nervioso de los mamíferos y parece tener un papel importante en el desarrollo posnatal de la plasticidad sináptica, así como en diversas funciones cerebrales (Odalís Fernández López et al., 2012, p.6). En este sentido, se han observado déficit en la expresión funcional de estos receptores en trastornos de ansiedad, epilepsia, déficits cognitivos, esquizofrenia, depresión y en abuso de sustancias (Benarroch et al., 2012, p.5; Odalís Fernández López et al., 2012, p.13).

La aminoración de GABA presente específicamente en el LCR se indica que puede ser causado por cuadros de estrés de tipo crónico, ansioso y depresivo. Es importante mencionar que los mencionados agentes agonistas son responsables del incremento de las funciones del GABA y como consecuencia, una reducción importante del estado de ansiedad (Navarro, 2012, p3.).

2.1.3 Datos estadísticos de ansiedad

Para el año de 2019, lo aproximado a una octava parte del planeta (equivalente a 970 millones de individuos) fueron diagnosticado con un cuadro de trastorno mental. Entre aquellos trastornos más comunes y evaluados destacan la depresión y la ansiedad, los cuales para el año 2020 sufrieron un aumento significativo a causa de la pandemia de COVID-19; los datos iniciales presentados por la Organización Mundial de la Salud presentaron un incremento del 26% al 28% en cuadros de ansiedad y depresión de alta complejidad en el lapso de un año. (OMS 2022).

Datos presentados por la Organización de las Naciones Unidas establecieron que, en Estados Unidos, las tasas de ansiedad y depresión alcanzaron hasta el 37% y el 30%, respectivamente, a finales de 2020, frente al 8,1% y el 6,5% respectivamente en 2019 antes de la pandemia declarada (ONU, 2023).

En México se encontró que los pacientes con enfermedades reumáticas eran mucho más propensos a estar ansiosos y deprimidos durante el brote de COVID-19 que antes de la pandemia. Los impulsores específicos de estas preocupaciones se relacionaban con: la escasez de medicamentos y la dificultad para encontrarlos a no poder acceder a la atención médica cuando la necesitaran (Ardila-Gómez et al., 2023, p.2).

Un estudio a nivel global sobre la prevalencia y la carga de los trastornos depresivos y de ansiedad debidos a la pandemia de COVID-19 reveló que las tasas de trastornos mentales aumentaron entre un 20% y un 40% en los países de América Latina y el Caribe, lo que supone uno de los mayores aumentos en el mundo (OMS, 2022).

Dentro del marco de la pandemia por COVID-19, según datos presentados por Sánchez-Vélez & Moreta-Herrera, 2022, indicaron que en Paraguay el 21,3% presentó sintomatología ansiosa – depresiva moderada y el 15,9% ansiedad y depresión severa. En Colombia, por otro lado, un estudio realizado por (Ardila-Gómez et al., 2023, p.3), encontró una prevalencia de depresión del 47,98% y de ansiedad del 27,06%.

2.1.4 Trastorno de ansiedad

El Instituto Nacional de Salud (NIH, de sus siglas en inglés) define al trastorno de ansiedad como la afección por la que una persona tiene preocupación y sentimientos de miedo, terror o intranquilidad excesivos. Es posible que un problema médico, un hecho traumático o estresante, ciertos medicamentos u otros factores provoquen un trastorno de ansiedad.

Existen varios tipos de trastornos de ansiedad, incluido el trastorno de ansiedad generalizada, el trastorno de pánico, el trastorno de ansiedad social y diversos trastornos relacionados con las fobias (Bandelow et al., 2017, p.8).

2.1.4.1 Trastorno de ansiedad generalizada

La característica fundamental del trastorno de ansiedad generalizada es la persistente presencia de ansiedad y preocupación intensa por un período que supera los seis meses. Estas se enfocan en una amplia variedad de eventos y situaciones, generando dificultades para que la persona logre manejar de manera efectiva este constante estado de inquietud (Bandelow et al., 2017, p.3).

Entre los principales síntomas que se pueden presentar dentro del trastorno de ansiedad generalizada se encuentran:

- Inquietud
- Fatiga precoz
- Dificultades para concentrarse
- Irritabilidad
- Tensión muscular
- Trastornos del sueño

2.1.4.2 Trastorno de pánico

Tanto el miedo como la incomodidad son dos estados importantes y destacables que se caracterizan en este trastorno, de igual forma, el paciente experimenta un estado en el que el mismo llega a perder el control sobre sus actos y estado físico bajo la presencia de un peligro real o ficticio ocasionado por el mismo estado patológico. (Dubovsky & Marshall, 2022, p.7).

Una sensación de estar fuera de control, o de tener miedo a la muerte o a una fatalidad inminente durante un ataque de pánico, una preocupación intensa sobre cuándo ocurrirá el próximo ataque de pánico, temor de ir o evitar ir a los lugares donde han tenido un ataque de pánico en el pasado (NIH, 2022).

Entre los síntomas físicos durante un ataque de pánico, podemos encontrar:

- Ritmo cardíaco aumentado
- Transpiración continua
- Estremecimiento
- Escalofrío continuo
- Apnea y fatiga
- Vértigo
- Comezón en extremidades superiores e inferiores
- Dolor precordial
- Repulsión y aversión

2.1.4.3 Trastorno de ansiedad social

El rasgo principal para la detección de este trastorno es el miedo continuo a situaciones de tipo social por temor a que resulten bochornosas. La exposición a estas situaciones produce casi de forma inmediata una respuesta de ansiedad donde dicha respuesta puede formar parte de una crisis de angustia situacional o más o menos relacionada con una situación específica. (Pichot et al., 1995).

Ciertos pacientes diagnosticados no tienen ansiedad relacionada con las interacciones de tipo social, sino que la adquieren cuando son expuestos específicamente frente a un público. Se llegan a presentar síntomas de desesperación y crisis personal cuando, por ejemplo, deben citar un discurso, competir en juegos deportivos grupales o al momento de tocar un instrumento musical en el escenario (NIH, 2022).

Entre la sintomatología presente en este trastorno se encuentra:

- Enrojecimiento, sudoración o temblores.
- Latidos rápidos del corazón
- Malestar estomacal

- Mantener una postura corporal rígida o comunicarse con un tono de voz notablemente bajo
- Dificultad para hacer contacto visual
- Inseguridad de sí mismos frente a otras personas o temor a que se les juzgue negativamente
- Evasión de los lugares donde hay otras personas.

2.1.5 Fobia específica

El principal rasgo identificativo de la fobia específica es un miedo altamente intenso y mantenido hacia situaciones claramente delimitados o definidos por el individuo. La exposición a cualquier estímulo antes mencionado suele provocar una respuesta inmediata relacionada a la ansiedad. (Pichot et al., 1995).

Aunque los adultos y jóvenes diagnosticados con este trastorno asumen conscientemente que su miedo es altamente injustificable e irracional, esto no ocurre con los menores de edad entre los tres a ocho años. En la mayoría de las ocasiones, el paciente evita mantener algún tipo de contacto con el estímulo por beneficio propio, pero a pesar de ello, en ciertos escenarios puede enfrentarse al problema incluso con gran miedo. (Pichot et al., 1995).

Entre los síntomas dentro de este trastorno se encuentran:

- Sudoración
- Respiración anormal
- Aceleración del latido del corazón
- Temblores
- Escalofríos
- Dolor en el pecho
- Sequedad de boca
- Mareos
- Dolor de cabeza

2.1.6 Tratamiento de la ansiedad

2.1.6.1 *Tratamiento no farmacológico*

Psicoterapia

La psicoterapia es un procedimiento de salud comunicacional establecido entre un terapeuta profesional y un paciente con una patología diagnosticada de salud mental que tiene como principal objetivo establecer mejoras en el paciente para mejorar la situación de salud mental, para así poder eliminar o disminuir los síntomas existentes, disminuir o cambiar los estados de comportamiento promoviendo así el desarrollo personal y la mejora en este ámbito (Luna et al., 2001, p.3).

2.1.6.2 Tratamiento farmacológico

Los antidepresivos son considerados el tratamiento farmacológico principal para la mayoría de los Trastornos de Ansiedad, excepto en el caso de las fobias específicas. En cuanto a estos trastornos, las terapias psicodinámicas y la Terapia Cognitivo-Conductual (TCC) han demostrado ser clínicamente efectivas. Es notable que el tratamiento no farmacológico para el trastorno de fobia específica muestra efectividad desde las primeras cinco sesiones (Delgado et al., 2021, p.7).

Sin embargo, hay implicaciones significativas asociadas con el sobretratamiento, que pueden conllevar riesgos para la salud del paciente. La iatrogenia, junto con la medicación que tiene potencial adictivo, representa un problema de salud serio, con posibles graves consecuencias a nivel individual, familiar y social. La adicción a los medicamentos incrementa el riesgo de accidentes, lesiones físicas, intoxicaciones y muerte prematura (Pichot et al., 1995, p.5).

La mayoría de los antidepresivos actúan sobre el sistema monoaminérgico, el cual influye directamente en el sistema de neurotransmisores, en especial la dopamina, la serotonina y la noradrenalina. Estos fármacos aumentan la disponibilidad de estos neurotransmisores en la hendidura sináptica y regulan los receptores postsinápticos (Goetter et al., 2020, p.3).

El efecto clínico de los antidepresivos suele manifestarse entre 2 y 4 semanas después de iniciar su uso, debido a cambios adaptativos en los neurotransmisores y sus receptores. Es crucial informar a los pacientes sobre el proceso del tratamiento, incluyendo la posibilidad de experimentar síntomas de ansiedad al principio, posibles efectos adversos y los riesgos asociados con la discontinuidad o suspensión abrupta del tratamiento (Goetter et al., 2020, p.8).

Los antidepresivos se clasifican en:

- **Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina (ISRS):** Estos comprenden fármacos como Escitalopram y Sertralina.
- **Inhibidores de la Recaptación de Serotonina-Noradrenalina (IRSN):** Ejemplos de estos son Venlafaxina, Duloxetina y Paroxetina.
- **Antidepresivos Tricíclicos (TCA):** Entre ellos se encuentran Clomipramina e Imipramina.
- **Inhibidores de la Monoaminoxidasa (IMAO):** Como moclobemida y fenelzina.

Entre estos, los más comúnmente utilizados son los Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina (ISRS) y los Inhibidores de la Recaptación de Serotonina-Noradrenalina (IRSN) (Goetter et al., 2020, p.8).

Las benzodiacepinas (BZD) son psicotrópicos que ejercen efectos ansiolíticos, hipnóticos, miorrelajantes, anticonvulsivantes y amnésicos, y son utilizadas en diversos trastornos de ansiedad por su eficacia en el alivio de síntomas de ansiedad e insomnio. No obstante, es importante tener en cuenta sus efectos adversos como ataxia, sedación, problemas al discontinuar su uso, síntomas de abstinencia, alteraciones cognitivas, complicaciones cuando se combinan con alcohol y el riesgo de dependencia a largo plazo (Alonso et al., 2018, p.4).

Estos medicamentos actúan en el Sistema Nervioso Central (SNC), específicamente en el sistema límbico, donde se encuentran receptores que permiten ejercer sus propiedades ansiolíticas y sedantes. Las BZD, al ser liposolubles, atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica y tienen una acción rápida cuando se administran por vía oral o parenteral. La vida media de estas sustancias es un factor clave en la elección de la BZD apropiada para uso clínico, siendo especialmente efectivas para tratamientos breves en pacientes con síntomas agudos (Delgado et al., 2021, p.12).

Las benzodiacepinas se clasifican según su semivida de eliminación, que depende de la liposolubilidad del fármaco, su metabolismo hepático, la presencia de metabolitos activos y la grasa corporal del paciente. Se dividen en tres categorías según su semivida de eliminación:

- **Acción Larga:** Semivida mayor a 24 horas.
- **Acción Intermedia:** Semivida entre 6 y 24 horas.
- **Acción Corta:** Semivida menor a 6 horas.

En situaciones excepcionales, las benzodiacepinas (BZD) están contraindicadas para pacientes con tendencias suicidas, enfermedades cardíacas, antecedentes de abuso de BZD u otras sustancias. Se puede considerar el uso de BZD en combinación con Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina (ISRS) o Inhibidores de la Recaptación de Serotonina-Noradrenalina (IRSN) durante las primeras semanas de tratamiento (Dolores & Martínez, 2023, p 6).

De acuerdo con (Bandelow et al., 2017, p 9), a diferencia de los Antidepresivos Tricíclicos (TCA), las BZD no generan un aumento inicial de nerviosismo e insomnio, pero pueden ocasionar depresión del sistema nervioso central, resultando en reacciones adversas. El uso prolongado de BZD durante 4 a 8 meses puede conducir a la dependencia en algunos pacientes, por lo que no se recomienda como tratamiento de primera línea.

En la práctica clínica, siempre se debe evaluar la relación riesgo-beneficio y determinar la medicación apropiada, así como la dosis y la duración del tratamiento.

2.1.7 Fitoterapia para la ansiedad

Es importante conocer y tener claro que el uso de material vegetal de ciertas plantas para el tratamiento de ciertos síntomas o sintomatologías que actúan directamente sobre el sistema nervioso central (SNC) es una práctica de varios años dentro del marco de la investigación científica (Romero-Cerecero et al., 2019, p.8).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce la relevancia de las plantas medicinales tanto en el tratamiento como en la prevención de diversas enfermedades. Además, destaca su importancia a nivel económico, ya que son una fuente valiosa para descubrir nuevas drogas, en algunos casos con costos considerablemente más bajos en comparación con la síntesis de nuevos fármacos (Avello & Cisternas, 2010, p.9).

La fitoterapia se fundamenta en el empleo de plantas medicinales o sus partes con propósitos terapéuticos, transformando el empirismo de la medicina tradicional en un fundamento científico. En este proceso, se someten a prueba las prácticas populares, permitiendo validar o descartar su uso. Esto asegura la adecuada utilización, eficacia y seguridad de las plantas medicinales en cuestiones terapéuticas (Romero-Cerecero et al., 2019, p.12).

2.1.8 Espinaca (*Spinacia oleracea*)

2.1.8.1 Descripción de la planta

- Sistema radicular: caracterizado por una raíz pivotante, poco ramificada y con desarrollo superficial.
- Tallo: erguido, con longitudes que varían de 30 cm a 1 m, portando las flores.
- Hojas: ubicadas en el tallo, de disposición más o menos alterna y con pecíolos, presentan formas y consistencias variables según la variedad. Tienen un color verde oscuro, con pecíolos cóncavos, a menudo con tonalidades rojas en la base. La longitud del pecíolo disminuye gradualmente a medida que sostiene las hojas más recientes y desaparece en las hojas en la parte superior del tallo.
- Flores: las flores masculinas se agrupan en espigas terminales o axilares, con aproximadamente 6-12 unidades. Estas flores poseen un color verde y constan de un perianto con 4-5 pétalos y 4 estambres. Las flores femeninas se encuentran en glomérulos axilares, caracterizadas por un perianto tetradentado, ovarios uniovulares, un único estilo y un estigma dividido en 3-5 segmentos. (Gil et al., 2010, p.9).



Ilustración 2- 2. Espinaca (*Spinacia oleracea*)

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

2.1.8.2 Habitat y distribución

La espinaca es un cultivo de amplia distribución global. Se cultiva en regiones tropicales a lo largo de todo el año, especialmente en tierras altas con climas frescos. En las zonas templadas, se cultiva al aire libre en áreas más bajas durante la primavera y el verano, o bajo invernadero durante el otoño e invierno (Huaraca Salazar, 2015, p.9).

2.1.8.3 Propiedades nutraceuticas

La espinaca, gracias a su contenido de vitamina K, desempeña un papel crucial en la formación de la protrombina, esencial para el proceso de coagulación sanguínea. Además, contribuye con hierro mineral, un componente vital de la hemoglobina y la mioglobina, y participa en diversos procesos enzimáticos. La espinaca también juega un papel importante en el transporte de oxígeno en el organismo (Huaraca Salazar, 2015, p.9).

El ácido fólico, una vitamina hidrosoluble, desempeña una función crucial en el desarrollo del material genético. Es esencial para la formación del tubo neural durante las primeras ocho semanas de gestación en mujeres embarazadas, así como para la participación en la producción de células sanguíneas y la reparación de tejidos musculares. Esta propiedad nutraceutica, quizás, destaca como una de las más significativas de la espinaca (Ramaiyan et al., 2020, p.5).

2.1.8.4 Estudios ansiolíticos realizados

Un estudio publicado por la Revista Médica de la República Islámica de Irán (MJIRI) ha determinado que la espinaca (*Spinacia oleracea*) es una planta que contiene abundantes cantidades de flavonoides (quercetina, miristicina, kaempferol, apigenina, luteolina), compuestos fenólicos (ácido paracumárico y ácidoferúlico), carotenoides (luteína y betacaroteno), vitaminas (K, B12, C, E y A) y minerales, necesarios para su estudio en la atenuación de la expresión de TNF- α e IL-1 β en ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) sometidas a estrés por restricción (Pezeshki-Nia et al., 2020, p.6).

En la Facultad de Ciencias de la ESPOCH se ha determinado actividad ansiolítica en algunas plantas endémicas del Ecuador con actividad ansiolítica demostrada y evaluada bajo rangos similares a la presente investigación como el uso del Laberinto en Cruz Elevado al igual que otros equipos disponibles en la institución.

2.1.9 Modelos animales para el estudio de la ansiedad

Las pruebas de comportamiento son muy útiles para comprender la enfermedad neuropsicótica y también para encontrar el tratamiento de una enfermedad en particular. Un nuevo compuesto o medicamento que se cree que tiene posibles efectos farmacológicos debe probarse en animales

antes de probarlo en humanos que tienen una fisiología similar a la de los humanos (Himanshu et al., 2020, p 6).

2.1.9.1 Pruebas condicionadas

Según Polanco et al., (2011, p.7), en los modelos animales para el estudio de la ansiedad se emplean pruebas condicionadas basadas en conductas aprendidas. Estos métodos, también conocidos como modelos de conflicto, incluyen procedimientos de castigo. En ellos, el castigo suele ser un estímulo aversivo, como un leve choque eléctrico, administrado a animales previamente condicionados para mostrar una respuesta específica.

Sin embargo, estos modelos enfrentan limitaciones significativas. Los animales deben ser expuestos a estímulos no habituales, lo que requiere un entrenamiento especial para enseñarles a emitir la respuesta deseada. Este aspecto ha sido destacado en estudios como el de Gómez et al., (2002, p.3), que señalan la necesidad de un proceso de aprendizaje previo en los sujetos animales.

2.1.9.2 Pruebas no condicionadas

En contraste con las pruebas condicionadas, éstos utilizan conductas no condicionadas, es decir, no se prepara al individuo de estudio bajo circunstancias estrictas ni establecidas bajo una norma. Aunque este tipo de pruebas revela resultados importantes a nivel basal evaluando ciertos parámetros de tipo “clínico”, dispone de un nivel aún más alto e importante a nivel de evaluación neurobiológica, debido a que no requieren procesos de preparación o entrenamientos y tienen menos probabilidad de que se relacione a procesos de motivación (Polanco et al., 2011, p.9; Rejón-Orantes et al., 2010, p.5).

Labetinto cruz elevado

Este equipo bajo su modelo de medición es uno de los métodos con más uso a nivel científico y está correctamente validado para evaluar la conducta de los roedores en su relación directa con la ansiedad y el uso de ansiolíticos, debido a que permite tener en cuenta los efectos de estos medicamentos en diferentes parámetros del equipo (Gómez et al., 2002, p.5).

La ventaja de este modelo es que permite la medición del miedo innato de esta especie por los espacios abiertos y de la carga alostática en donde los fármacos se pueden administrar en la

ausencia de un estresor y después de la exposición al estresante. El aumento en el tiempo que el roedor explora los brazos abiertos de la cruz y la frecuencia de entradas a éstos indican el efecto como ansiolítico (Sierra & Ortega, 2003.).

Plataforma agujereada

La metodología de la prueba de la plataforma con agujeros fue introducida por Boisser y Simón en 1962 (Saitoh et al., 2006, p.6). Este enfoque se utiliza para examinar compuestos ansiolíticos, basándose en la teoría de Montgomery de 1955, que sugiere que un ratón enfrenta un conflicto al ser expuesto a un entorno desconocido, oscilando entre el miedo a lo nuevo y su instinto exploratorio (Ariza et al., 2006, p.3; Lourenço Da Silva & Elisabetsky, 2001, p.9).

Existen múltiples variantes de este diseño, siendo común el uso de una plataforma gris de 40 x 40 cm con un grosor de 2,2 cm, dotada de 16 agujeros de 3 cm de diámetro dispuestos de manera uniforme en la superficie, y elevada a 15 cm del suelo (Kamei et al., 2004, p.12; Lourenço Da Silva & Elisabetsky, 2001, p.15; Takeda et al., 1998, p.9).

El procedimiento consiste en situar al ratón en el centro de la plataforma y observar su comportamiento durante cinco minutos. Se registra la cantidad de veces que el ratón realiza la acción de "espíar" los agujeros, lo cual implica introducir su cabeza hasta las orejas en ellos. La cantidad de exploraciones es inversamente proporcional al nivel de ansiedad del animal; los agentes ansiolíticos, como las benzodiazepinas, aumentan la cantidad y duración de estas exploraciones de manera proporcional a la dosis administrada (Sonavane et al., 2001, p.8; Takeda et al., 1998, p.11).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

La investigación se focalizó en realizar la evaluación de la actividad ansiolítica del extracto hidroalcohólico de las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) en ratones (*Mus musculus*) mediante el uso del método de laberinto de cruz elevado (validado) y plataforma agujereada (no validado). De este modo, se buscó verificar la concordancia de resultados entre ambos métodos utilizados.

3.1 Lugar de investigación

La investigación se desarrolló en los laboratorios de Productos Naturales, Bioterio, Tecnología Farmacéutica y Análisis Instrumental de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, matriz Riobamba.

3.2 Recolección del material vegetal

Las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) fueron recolectadas en el Mercado de Productos Agrícolas “San Pedro de Riobamba”, ubicado en la Región Sierra del Ecuador, Provincia de Chimborazo, cantón Riobamba; Avenida Leopoldo Freire y Avenida Circunvalación. Las coordenadas geográficas presentadas por Google Earth fueron:

- Longitud: 1° 41' 07" S
- Latitud: 78° 37' 57" W
- Altitud media: 2.731 m

3.3 Materiales, equipos y reactivos

3.3.1 Material vegetal

Hojas secas de espinaca (*Spinacia oleracea*)

3.3.2 Material biológico

Para evaluar la actividad ansiolítica, se emplearon ratones macho (*Mus musculus*) con edades comprendidas entre los 2 y 3 meses, y un peso aproximado de 25 a 30 g. Estos animales fueron suministrados por el bioterio de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Durante el

experimento, se les proporcionó alimento ad libitum, asegurándose de que cada porción no excediera los 5 g.

3.3.3 Materiales de laboratorio, equipos y reactivos

Tabla 3-2. Lista de materiales, equipos y reactivos utilizados en la investigación

ACTIVIDAD	MATERIALES	EQUIPOS	REACTIVOS
Obtención de la Hoja Seca y Triturado.	Papel Periódico Papel Aluminio Espátula	Estufa	-
Control de Calidad de la Hoja Seca.	Cápsulas Crisoles Pinza Vidrio reloj Reverbero Papel Filtro Pipeta de 5 mL Embudo	Balanza analítica Analizador de humedad Estufa Desecador Mufla Sorbona	Agua destilada Nitrato de plata Ácido clorhídrico 10%
Tamizaje Fitoquímico.	Frasco ámbar 1000 mL Frasco ámbar 500 mL Gradilla Tubos de ensayo Papel Aluminio Pipeta de 1 mL Pipeta de 5 mL Popeta de 10 mL Vaso de precipitación 250 mL y 500 mL Pinza Embudo	Balanza analítica Sonicador Sorbona Baño María Bomba de vacío	Agua destilada Éter etílico Alcohol 96% Reactivo Sudán III Ácido clorhídrico 1% Reactivo Dragendorff Cloruro de Sodio Reactivo Mayer Reactivo Wagner Reactivo Baljet Cloroformo Hidróxido de sodio Alcohol amílico Anhídrido acético

			<p>Ácido sulfúrico</p> <p>Solución A Fehling</p> <p>Solución B Fehling</p> <p>Tricloruro férrico</p> <p>5%</p> <p>Acetato de sodio</p> <p>Magnesio metálico</p> <p>Carbonato de sodio</p>
<p>Control de Calidad del Extracto Hidroalcohólico.</p>	<p>Vaso de precipitación 25 mL</p> <p>Pipeta 5 mL</p> <p>Cápsula</p> <p>Pinza</p> <p>Picnómetro</p> <p>Piseta</p> <p>Reverbero</p>	<p>pH metro</p> <p>Refractómetro</p> <p>Estufa</p> <p>Baño María</p>	<p>Alcohol al 96%</p> <p>Agua destilada</p>
<p>Obtención del Extracto Concentrado.</p>	<p>Balón esmerilado 500 mL</p> <p>Papel aluminio</p> <p>Papel filtro</p> <p>Espátula</p> <p>Probeta 250 mL</p>	<p>Rotavapor</p> <p>Sonicador</p> <p>Liofilizador</p> <p>Estufa</p> <p>Congelador</p>	<p>Alcohol al 96%</p> <p>Agua destilada</p> <p>Nitrógeno líquido</p>
<p>Ensayos para Cuantificación de Fenoles y Flavonoides</p>	<p>Pipeta de 1, 5 y 10 mL</p> <p>Balón aforado de 10, 25 y 250 mL.</p> <p>Puntas amarillas y azules</p> <p>Pipeta automática 1000 uL</p> <p>Tubos de ensayo</p> <p>Espátula</p> <p>Piseta</p> <p>Gradilla</p>	<p>Balanza analítica</p> <p>Espectrofotómetro</p> <p>Agitador</p>	<p>Agua destilada</p> <p>Alcohol al 96%</p> <p>Reactivo Folin</p> <p>Ciocalteu</p> <p>Ácido gálico</p> <p>Carbonato de sodio 7.5%</p> <p>Quercetina</p> <p>Nitrato de sodio 5%</p> <p>Cloruro de aluminio 10%</p> <p>Hidróxido de sodio 1M</p>

Evaluación de la Actividad Ansiolítica	Cubeta de plástico	Balanza analítica	Propilenglicol 15%
	Rejillas	Plataforma agujereada	Clonazepam 2.5
	Bebedores 500 mL	Laberinto en cruz	mg/mL
	Jeringuilla 0,5 mL	elevado	Agua destilada
	Cánula		

Realizado por: Guzmán J., 2024.

3.3.4 Control de calidad de la planta seca

3.3.4.1 Determinación de Humedad

Procedimiento: Se pesó aproximadamente 5 g de la planta seca y triturada. Se colocó la muestra en el analizador de humedad RADWAG, a una temperatura de 105 °C (Esther et al., 2020, p 7).

3.3.4.2 Determinación de Cenizas totales

Procedimiento: se inició el proceso colocando entre 2 y 3 g del material vegetal seco y pulverizado en un crisol previamente pesado. Utilizando un reverbero, se llevó a cabo la carbonización de la muestra. Posteriormente, se ubicó el crisol en la mufla, donde se incineró a una temperatura de 700°C durante 2 horas. Después de este paso, se enfrió el crisol en un desecador y se procedió a pesarlo. Este proceso se repitió hasta que se logró un peso constante, asegurando la precisión de los resultados obtenidos. (Esther et al., 2020, p 9).

Expresión de resultados:

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

Donde:

%C = Porcentaje de cenizas totales

m2 = peso del crisol con la muestra vegetal incinerada (g)

m1 = peso del crisol con la muestra vegetal (g)

m = peso del crisol vacío (g)

100 = factor matemático

3.3.4.3 *Cenizas insolubles en HCL*

Procedimiento: Después de obtener las cenizas totales, se agregaron 3 mL de ácido clorhídrico al 10%. A continuación, se cubrió el crisol con un vidrio reloj y se calentó sobre un baño de agua hirviendo durante 10 minutos. Seguidamente, se procedió a lavar el vidrio reloj con 5 mL de agua caliente, agregando este líquido al contenido del crisol. A través de un papel filtro, se filtró y lavó el contenido hasta eliminar los cloruros. La solución filtrada, junto con el residuo, se transfirió nuevamente al crisol y se carbonizó utilizando el reverbero. Posteriormente, se incineró en la mufla a 700°C durante 2 horas. Luego de este proceso, se colocó en un desecador y se pesó hasta alcanzar una masa constante (Ferwinson Lara Flores et al., 2020, p 35).

Expresión de resultados:

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

Donde:

%B = Porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

m2 = peso del crisol con la porción de cenizas de ácido clorhídrico (g)

m1 = peso del crisol con la muestra de ensayo (g)

m = peso del crisol vacío (g)

100 = factor matemático

3.3.4.4 *Cenizas solubles en agua*

Procedimiento: Se comenzó añadiendo 20 mL de agua destilada a las cenizas totales, llevándolas a ebullición durante aproximadamente 5 minutos. Posteriormente, se filtró la solución mediante papel filtro y se transfirió al crisol. Luego, se sometió a carbonización utilizando el reverbero y se procedió a incinerar en la mufla a 700°C durante 2 horas. El crisol, una vez incinerado, se colocó en un desecador y se pesó hasta alcanzar un peso constante (Ferwinson Lara Flores et al., 2020, p 15).

Expresión de resultados:

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

Donde:

%Ca = Porcentaje de cenizas solubles en agua

m2 = peso del crisol con las cenizas totales (g)

m1 = peso del crisol con la muestra del ensayo (g)

ma = peso del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

m = peso del crisol vacío (g)

100 = factor matemático

3.3.5 Screening fotoquímico

El screening fitoquímico, también denominado tamizaje fitoquímico, se basa fundamentalmente en la identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de productos naturales. La presente técnica se realiza consecutivamente a los extractos etéreo, alcohólico y acuoso del producto natural con el fin de identificar y comparar los metabolitos secundarios extraídos con cada disolvente de diferentes polaridades (Castillo et al, 2022, p 35)

3.3.6 Preparación de los extractos

Se inició el proceso tomando la muestra seca y pulverizada de las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*), pesando 40 g. Luego, se le incorporaron los siguientes solventes: éter etílico, alcohol etílico al 96%, y agua destilada.

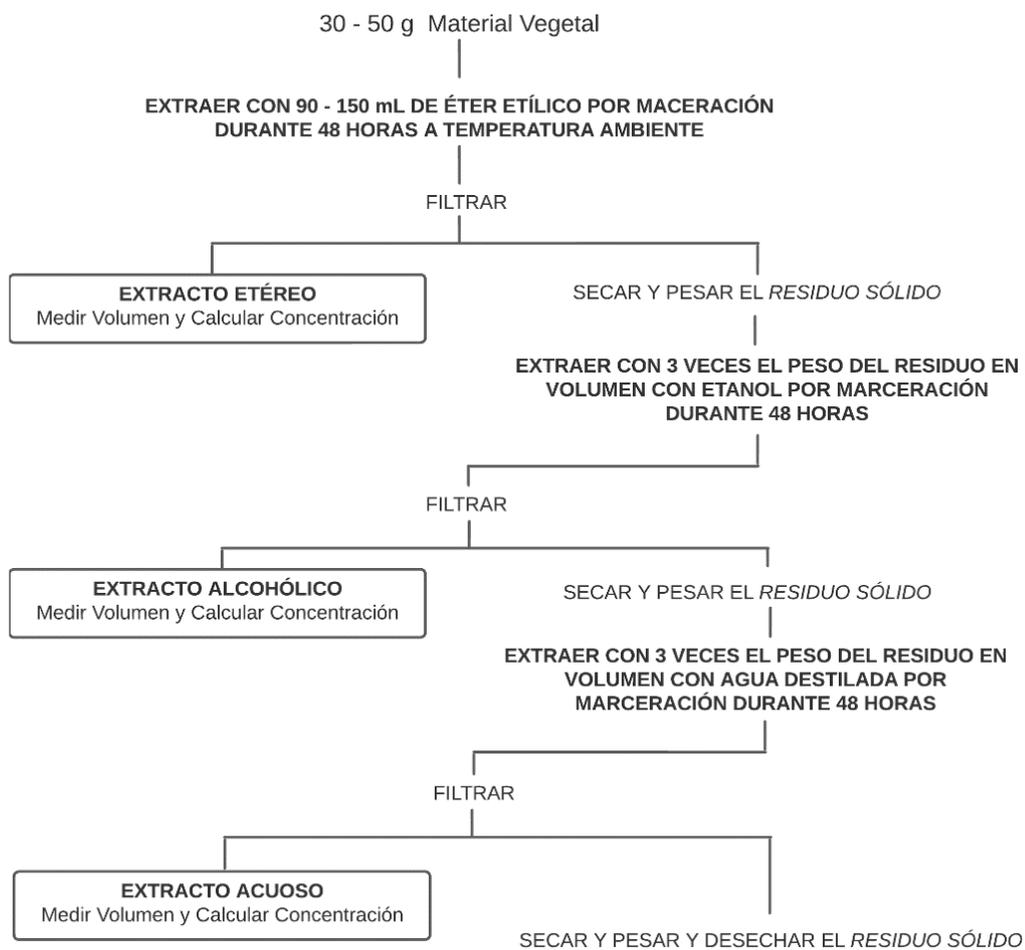


Ilustración 3-3. Esquema de la elaboración del Tamizaje Fotoquímico

Fuente: Miranda y Cuellar, 2012

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

Después de haber obtenido los extractos en el periodo establecido de 48 horas, se procedió a realizar los ensayos respectivos para cada solvente. Los análisis se detallan a continuación:

Ensayo extracto etéreo

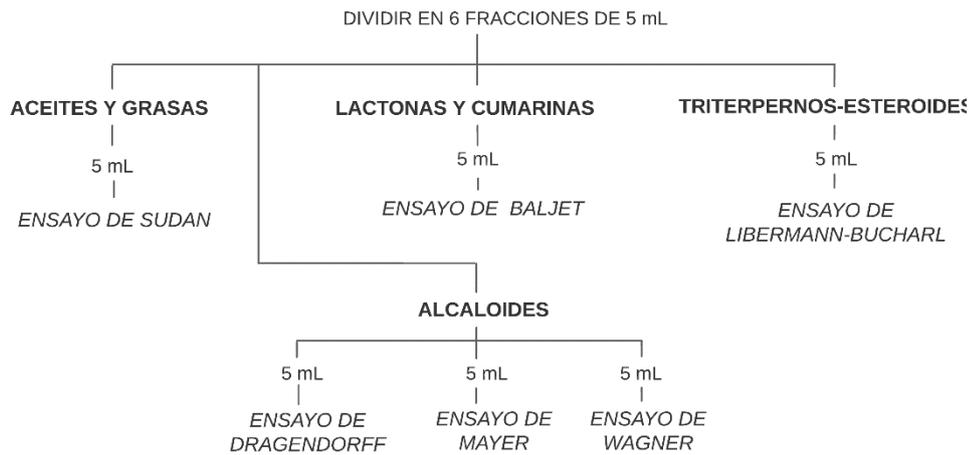


Ilustración 3-4. Esquema de ensayos del extracto etéreo para el Tamizaje Fotoquímico

Fuente: Miranda y Cuellar, 2012.

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

Ensayo extracto alcohólico

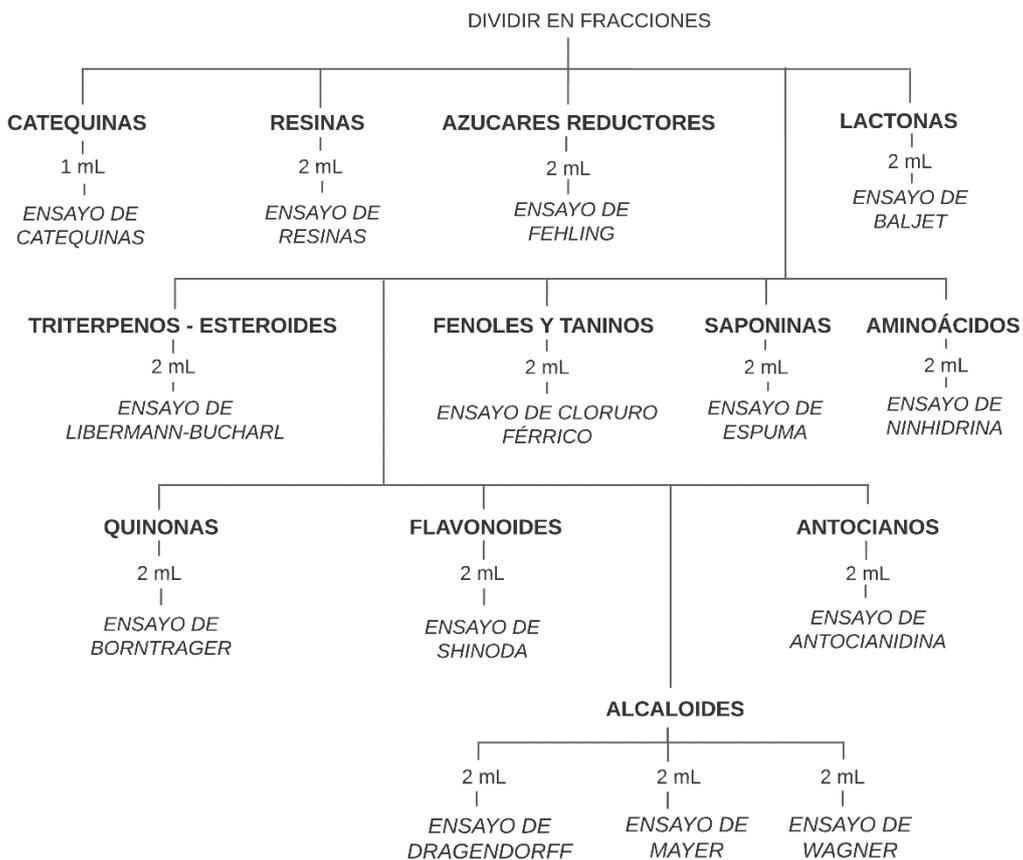


Ilustración 3-5. Esquema de ensayos del extracto alcohólico para el Tamizaje Fitoquímico.

Fuente: (Miranda y Cuellar, 2012)

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

Ensayo extracto acuoso



Ilustración 3- 6. Esquema de ensayos del extracto acuoso para el Tamizaje Fotoquímico

Fuente: (Miranda y Cuellar, 2012)

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

3.3.7 Preparación del extracto hidroalcohólico

Se empezó con el pesado de 50 g de muestra vegetal de espinaca (*Spinacia oleracea*) al 70% y se lo dejó macerar por 72 horas. Después de la maceración en el tiempo determinado, se colocó el frasco en el sonicador durante 15 minutos para su posterior filtración y estudio. Dicho resultado se colocó en el equipo Rotavapor donde se produciría un efecto de evaporación en el que eliminaríamos el alcohol de la solución preparada.

3.3.7.1 Control de calidad del extracto hidroalcohólico

3.3.7.1.1 Requisitos organolépticos

Procedimiento: para esta prueba se utilizaron los sentidos del gusto, la visión y el olfato donde se verificó el color, el aspecto, el color, sabor y olor del extracto.

Este análisis ayuda a garantizar la calidad del extracto a utilizar para los posteriores ensayos.

3.3.7.1.2 Índice de refracción

Procedimiento: se empleó un refractómetro KEM modelo RA-620 debidamente calibrado. En este procedimiento, se depositó una gota de la muestra sobre el prisma del refractómetro. Posteriormente, se ajustó la luz mediante el espejo para lograr la lectura adecuada y obtener el valor final.

3.3.7.1.3 Determinación de pH

Procedimiento: se empleó un pHmetro digital para obtener este valor. En el proceso, se colocó una pequeña cantidad del extracto hidroalcohólico en un vaso de precipitación y se introdujo el electrodo del pHmetro para llevar a cabo la medición correspondiente.

3.3.7.1.4 Densidad relativa

Procedimiento: se empleó un picnómetro que fue previamente pesado para obtener el valor del picnómetro seco y vacío. Posteriormente, se llenó el picnómetro con agua destilada a 25°C y se volvió a pesar. Este proceso se repitió, pero en esta ocasión se llenó el picnómetro con el extracto hidroalcohólico, permitiendo que reposara durante 15 minutos a 25°C, para luego proceder a pesarlo nuevamente.

Expresión de resultados:

$$D = \frac{m1 - m}{m2 - m}$$

Donde:

D = densidad relativa (g/ml)

m = valor del picnómetro vacío

m1 = valor del picnómetro con el extracto hidroalcohólico

m2 = valor del picnómetro con agua destilada

3.3.7.1.5 Sólidos totales

Procedimiento: se realizó la tara de una cápsula a 105°C, luego se añadieron 5 mL del extracto hidroalcohólico y se permitió su evaporación mediante un baño maría. Posteriormente, la cápsula se colocó en una estufa durante 3 horas a una temperatura constante de 105°C. Al finalizar este proceso, la cápsula se ubicó en un desecador para enfriarse y alcanzar la temperatura ambiente, tras lo cual se procedió a pesarla.

Expresión de resultados:

$$ST = \frac{Pr - P}{V} \times 100$$

Donde:

ST = Sólidos totales en la muestra (%)

Pr = peso de la cápsula con el residuo (g)

P = peso de la cápsula tarada y vacía (g)

V = volumen de la alícuota del ensayo (mL)

3.3.8 Determinación de fenoles totales

Procedimiento: en el procedimiento, se tomaron alícuotas de la muestra y de las diferentes soluciones estándar de ácido gálico. Posteriormente, se agregaron 0.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu al 20%, se esperó durante 5 minutos y, transcurrido este tiempo, se añadieron 0.5 mL de Na₂CO₃ al 20% y 5 mL de agua destilada. La mezcla resultante se dejó reposar por 2 horas a temperatura ambiente, evitando la exposición directa a la luz. Finalmente, se realizaron las lecturas de las absorbancias en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm (Pachacama, 2020, p 55).

3.3.9 Determinación de flavonoides totales

Procedimiento: en el procedimiento, se extrajo una alícuota de la muestra y de la solución estándar de quercetina. Posteriormente, se añadieron 0.3 mL de nitrato de sodio al 5% y 4 mL de agua destilada. Tras esperar durante 6 minutos, se introdujeron 2 mL de hidróxido de sodio 1 M. Finalmente, se dejó reposar la mezcla y se realizaron las lecturas de las absorbancias en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm (Pachacama, 2020, p 42).

3.4 Actividad ansiolítica

3.4.1 Equipo electrónico Laberinto en Cruz Elevado

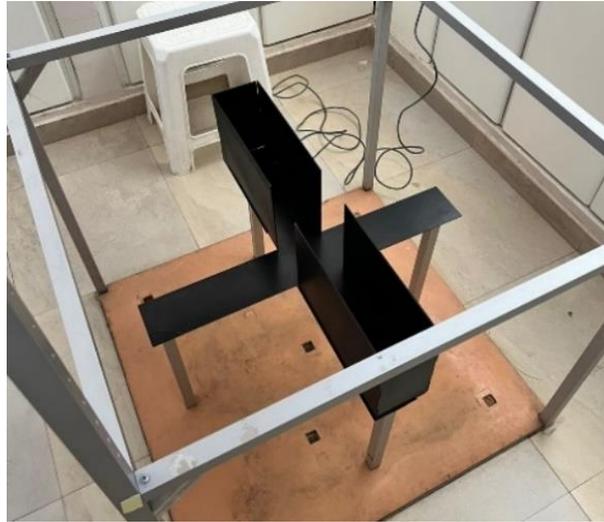


Ilustración 3-7. Equipo de medición "Laberinto en cruz elevado"

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

Este equipo consiste en un laberinto en Cruz Elevado elaborado en acrílico, conformado por cuatro brazos perpendiculares con dimensiones de 30 x 10 cm. Dos de estos brazos presentan paredes laterales de 20 cm de altura y están elevados mediante un soporte de 38 cm en cada uno. Además, incluye un soporte metálico envuelto por una cortina que bloquea la entrada de luz, albergando en su interior una cámara de video (Moreno Avilés et al., 2018, p 42).

Parámetros de medición:

1. Duración en brazos abiertos: Un tiempo prolongado en esta área sugiere que el roedor no experimenta ansiedad (Pachacama, 2020, p51).
2. Duración en brazos cerrados: Si el roedor pasa más tiempo aquí, indica ansiedad y preferencia por su zona de confort (Pachacama, 2020, p51).
3. Duración en la zona central: Permanecer en esta área indica que el roedor está intentando aventurarse en nuevos entornos (Pachacama, 2020, p51).
4. Cantidad de accesos a los brazos abiertos: Un mayor número de accesos refleja una mejor movilidad del roedor (Pachacama, 2020, p51).
5. Cantidad de accesos a los brazos cerrados: Al igual que con los brazos abiertos, más accesos indican una mejor movilidad (Pachacama, 2020, p51).
6. Cantidad de accesos al centro: Un número elevado de accesos también señala una mejor locomoción (Pachacama, 2020, p51)..

7. Distancia total recorrida: Un roedor relajado tiende a recorrer mayores distancias (Pachacama, 2020, p51).
8. Velocidad media: Una velocidad de desplazamiento más alta es indicativo de una mejor locomoción (Pachacama, 2020, p51).

3.4.2 Equipo Plataforma agujereada



Ilustración 3-8. Equipo de medición "Plataforma agujereada"

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

Para el experimento, se empleó una plataforma de plástico acrílico de 50 x 50 cm, situada a 15 cm del suelo, con 16 orificios de 3 cm de diámetro distribuidos de manera equidistante. El procedimiento comenzó situando al ratón en el centro de la plataforma perforada. Durante un periodo de 5 minutos, se observó y registró la cantidad de ocasiones en que el roedor inspeccionaba los orificios.

Se define como "espiar" cuando el ratón introduce la cabeza en los agujeros hasta el nivel de las orejas. La reducción en la frecuencia de estas exploraciones indica un menor nivel de ansiedad en el animal (Castañeda Campos & Castañeda Campos, 2022).

3.5 Análisis estadístico

Los datos estadísticos recolectados fueron tabulados en el programa estadístico SPSS 24, donde en principio, se verificó que los resultados obtenidos cumplieran con los parámetros necesarios previos antes de la ejecución estadística:

- **Distribución normal:** prueba estadística de Kolmogorow -Smirnov

- **Homogeneidad de varianzas:** estadístico de Levene.

Posterior a la verificación de los datos evaluados anteriormente, y una vez estos aprobados, se procedió a realizar el estadístico principal (ANOVA) para comparar las dosis estableciendo que:

- **Hipótesis nula (H_0):** Las medias de los parámetros en los diferentes tratamientos son iguales.
- **Hipótesis de investigación (H_a):** Existe al menos una media de parámetros que es diferente.

Si los resultados de la prueba ANOVA son inferiores al nivel de significancia ($< 0,01$), se interpreta que al menos hay una diferencia significativa entre un par de medias. Para identificar específicamente qué pares de medias difieren, se empleó la prueba post hoc Tukey. Esta prueba se utiliza principalmente para verificar la significancia estadística en las relaciones entre dos conjuntos de datos, contribuyendo así a una toma de decisiones más fiable y fundamentada.

CAPÍTULO IV

4. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Control de calidad de la droga cruda

La calidad es una preocupación primordial en todas las áreas de la vida, especialmente en los productos farmacéuticos destinados al bienestar humano (Balekundri & Mannur, 2020). Tanto los productos químicos farmacéuticos sintetizados como las medicinas a base de plantas deben cumplir con normativas estrictas de control de calidad antes de ser comercializados (Balekundri & Mannur, 2020; Zhang et al., 2012).

Es crucial asegurar la calidad y estandarización de las medicinas a base de plantas para garantizar su seguridad, eficacia y consistencia, dada la flexibilidad en las regulaciones que ha llevado a una disminución en los estándares de calidad, con prácticas como la adulteración, sustitución de ingredientes y muchas otras formas que tienden a disminuir la calidad (Balekundri & Mannur, 2020; Rashid et al., 2018; Wang et al., 2023).

Los procedimientos de control de calidad para materiales de plantas medicinales implican la evaluación de la pureza mediante ensayos fisicoquímicos, que abarcan la determinación de los niveles de cenizas, contenido de humedad y otros parámetros significativos (Balekundri & Mannur, 2020; Kumari & Kotecha, 2016). Como se puede apreciar en la Tabla 1, se examinaron cuatro parámetros de acuerdo con las pautas establecidas en la normativa USP N°42, junto con sus límites correspondientes según dicha normativa.

Tabla 4-3. Resultados del control de calidad de hojas secas de *Spinacia oleracea*

Parámetro	% en <i>Spinacia oleracea</i>	Límites de referencia
Humedad	12,73 ± 0,05	Hasta 14 %
Cenizas Totales	9,70 ± 0,03	Hasta 12 %
Cenizas solubles en agua	5,87 ± 0,01	Hasta 7 %
Cenizas insolubles en HCl	1,87 ± 0,03	Hasta 5 %

Nota. Los valores se expresan como media ± desviación estándar (DE) de seis determinaciones independientes. Los límites de referencia se ajustan acorde a la normativa USP N° 42.

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

Los resultados obtenidos (Tabla 4-3) se encuentran dentro de los límites permitidos establecidos por la normativa aplicada (USP N°42) para todos los parámetros analizados. La evaluación de cenizas en el material vegetal proporciona información sobre la presencia de minerales y materiales terrosos (Dinakaran, Chelle & Avasarala, 2019). En este estudio, se registró un contenido del $9,70 \pm 0,03$ %, notablemente inferior al obtenido por Sonkamble & Pandhure (2017), que fue del 18,50 % en hoja no seca de *Spinacia oleracea*. Según Kadam et al., (2013), la cantidad y composición de las cenizas resultantes de la combustión del material vegetal varían significativamente según diversos factores, como la parte de la planta, su edad y el tratamiento aplicado.

La determinación de la ceniza soluble en agua se emplea para cuantificar la cantidad de compuestos inorgánicos presentes en una muestra sólida (Dinakaran, Chelle & Avasarala, 2019). En este estudio, se observó un porcentaje de $5,87 \pm 0,01$ %, considerablemente superior al valor obtenido por Sonkamble & Pandhure (2017), que fue del 2,35%. Por otro lado, las cenizas insolubles en ácido, compuestas principalmente de sílice, señalan la presencia de contaminación por material terroso (Dinakaran, Chelle & Avasarala, 2019). En este estudio, se registró un valor del $1,87 \pm 0,03$ %, significativamente inferior al 16,15 % reportado por Sonkamble & Pandhure (2017).

En cuanto al contenido de humedad, en este estudio se registró un $12,73 \pm 0,05$ %, notablemente superior al estudio de Sonkamble & Pandhure (2017), que fue del 6,79 %, dicha disparidad presentada principalmente por la técnica utilizada y la temperatura de tratamiento. De acuerdo a Dinakaran, Chelle & Avasarala (2019), es fundamental mantener el contenido de humedad de la planta en niveles mínimos debido a que este estado, es esencial para prevenir la proliferación de bacterias, levaduras y hongos durante el almacenamiento y tratamiento de la muestra.

4.2 Tamizaje Fitoquímico

Tabla 4-4. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etéreo, alcohólico y acuoso.

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	-	Triterpenos y esteroides	-	++	N/A
BOUCHARD					
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	++	+
ANTOCIANIDIN AS		Secuencias de grupos de flavonoides	N/A	+	N/A
Mucilagos		Polisacáridos	N/A	N/A	-
Principios amargos y astringentes		N/A	N/A	N/A	N/A

Nota. (-) No detectado; (+) Presencia escasa; (++) Presencia relativamente abundante, (+++) Presencia abundante

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

La Tabla 4-4 muestra que en el extracto etéreo se encuentra una baja cantidad de grasas y una presencia moderada de alcaloides. En cuanto al extracto alcohólico, se observa una moderada presencia de alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides y saponinas, con una escasa presencia de azúcares, lactonas y cumarinas. Por último, en el extracto acuoso se evidencia una presencia abundante de compuestos fenólicos y saponinas, con una moderada cantidad de alcaloides, y una escasez de flavonoides y azúcares.

Se confirmó la presencia de flavonoides y fenoles tanto en el extracto alcohólico como en el acuoso, respaldando los hallazgos de un estudio de la Revista Médica de la República Islámica de Irán (MJIRI). Este estudio señaló que *Spinacia oleracea* contiene cantidades significativas de flavonoides como quercetina, miristicina, kaempferol, apigenina y luteolina, así como compuestos fenólicos como ácido paracumárico y ácido ferúlico (Balasundram, 2006, p. 195).

Los alcaloides presentes en *Spinacia oleracea* poseen actividad simpaticomimética y alucinógena, interviniendo además en las reacciones principales del metabolismo y actuando en

el sistema nervioso central como alucinógeno o depresor del SNC (Arango, 2008, pp. 6-13). Es importante considerar que la planta de estudio, a pesar de no ser endémica del Ecuador, cuenta con una gran variedad de usos ancestrales no probados científicamente, lo que lo hace un blanco de estudio de gran interés farmacológico por presentar diversidad de metabolitos secundarios.

4.3 Control de calidad extracto hidroalcohólico

Tabla 4-5. Control de calidad del extracto hidroalcohólico de hojas de *Spinacia oleracea*.

Parámetro	Características
Características organolépticas	
Olor	Alcohólico aromático
Color	Verde oscuro intenso
Aspecto	Turbio
Sabor	Amargo ligeramente astringente
Características físico – químico	
Índice de refracción	1.37
pH	6.92
Densidad relativa	1.1353 g/mL
Sólidos totales (%)	1.904

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

En la Tabla 4-5 se detallan las características organolépticas y físicoquímicas exhibidas por el extracto hidroalcohólico de hojas de *Spinacia oleracea*. Estas características organolépticas, como se registra en el extracto, coinciden con lo observado por Ewais et al. (2023) y Vecchia et al. (2022), quienes de igual forma obtuvieron y reportaron un extracto con una coloración verdosa, sabor fuerte característico a cualquier planta y un sabor amargo principalmente relacionado a la preparación del extracto hidroalcohólico.

En el trabajo realizado por Gutiérrez et al. (2018), se registró un índice de refracción de $1,36 \pm 0,00$ para el extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Phania matricarioides* (Spreng.) Griseb. Por otro parte, Fierascu et al. (2018), informaron la presencia de un rango del índice de refracción de 1,32 a 1,37 para el extracto hidroalcohólico de *Juniperus communis* L. Por tanto, se sugiere que el extracto hidroalcohólico de hojas de *Spinacia oleracea* se encuentra dentro de este rango, con un valor de 1,37. Es importante mencionar que cada sustancia tiene un índice de refracción

característico que puede ser utilizado para identificar el tipo de solvente usado en la extracción y los posibles metabolitos secundarios presentes en ellos (Fierascu et al. 2018).

Asimismo, según la investigación realizada por Sengupta et al. (2014), el pH de *Spinacia oleracea* mostró un carácter neutro tanto en un extracto etanólico como hidroalcohólico, corroborando los resultados de este estudio que revelaron un pH de 6,92, indicando así que el extracto de estudio se encuentra en un punto óptimo donde no existe acidez ni alcalinidad que pueda generar un desequilibrio en el organismo del individuo.

Del mismo modo se observó que la densidad relativa encontrada en el extracto se encuentra dentro de los valores mencionado por otros autores como el de González Villalva, 2013, pp.40, con un valor de 1,028 para el extracto de romero o Erazo, 2018, pp. 34 con un valor de 1,19 para el extracto hidroalcohólico de *Tagetes filifolia*. En cuanto a los sólidos disueltos se encontró valores bajos en consideración a otros como el de Erazo, 2018, pp. 34 en que se encontraron valores de 5,34, 5,02 y 2,61 para los extractos hidroalcohólicos de *Ricinus communi*, *Nicotiana tabacum* y *Tagetes filifolia*, respectivamente

4.4 Cuantificación de fenoles y flavonoides del extracto hidroalcohólico de hojas de espinaca

Tabla 4- 6. Cuantificación de la concentración de fenoles y flavonoides de *Spinacia oleracea*.

Fenoles totales (mg EAG/g PS)	Flavonoides totales (mg EQ/g PS)
15,74 ± 0,29	18,77 ± 0,312

Nota. Los valores se expresan como media ± DE de seis determinaciones independientes. PS: Peso Seco; EQ: Equivalente de Quercetina; EAG: Equivalente de Ácido Gálico.

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

La concentración de fenoles totales en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Spinacia oleracea* se estableció en 15,74 ± 0,29 mg EAG/g PS (Tabla 6), mostrando una significativa disparidad respecto al estudio de Kaliyaperumal & Radhika (2020), quienes registraron un valor de 2,06 mg EAG/g PS en extracto metanólico, y 4,33 mg EAG/g PS en extracto con etil acetato, esta diferencia se la puede atribuir al tipo de solvente utilizado. De igual manera, el estudio de Pandjaitan et al. (2005), las

hojas maduras de *Spinacia oleracea* presentaron una concentración de fenoles de 15,0 a 35,2 mg EAG/g PS.

En cuanto a la cuantificación de flavonoides totales, el presente estudio mostró resultados de $18,77 \pm 0,312$ mg EQ/g PS (Tabla 6), una cifra ligeramente superior al registro de Kaliyaperumal & Radhika (2020), quienes reportaron 11,41 mg EQ/g PS en extracto metanólico y 3,37 mg EQ/g PS en extracto etil acetato. Por otro lado, en el estudio de Pandjaitan et al. (2005), las hojas maduras de *Spinacia oleracea* evidenciaron en extracto alcohólico la presencia de 6,6 a 16,4 mg EAG/g PS de flavonoides totales, siendo un valor muy por debajo del encontrado en el presente estudio.

La composición fenólica de las plantas está influenciada por diversos elementos, como la variabilidad genética, cosecha, condiciones ambientales y suelo, procesamiento de muestras, almacenamiento, desarrollo de la planta y los tratamientos específicos aplicados (Pratyusha, 2022). La variabilidad de estos factores podría tener un impacto significativo en la composición fenólica y, por ende, en su utilidad y posibles aplicaciones en diversos ámbitos (Dai & Mumper, 2010; Pratyusha, 2022).

Es así como los niveles de fenoles obtenidos en esta investigación fueron significativamente inferiores, mientras que los de flavonoides superaron los reportados por Ghazizadeh et al. (2020), para el extracto hidroalcohólico de *Melissa officinalis* L., la misma que ha sido conocida por sus propiedades ansiolíticas y antidepresivas. Además, en el mencionado estudio, se registraron concentraciones de $62,085 \pm 1,136$ mg EAG/g PS y $15,87 \pm 2,85$ mg EQ/g PS para fenoles y flavonoides, respectivamente.

Además, analizando otros extractos hidroalcohólicos de diversas plantas con propiedades ansiolíticas como *Lavandula angustifolia* y *Lavandula x intermedia*, se evidenciaron valores entre 17,83 y 26,21 EAG/g PS para la concentración de fenoles y 10,30 a 19,81 y 13,83 a 17,36 mg EQ/g PS para flavonoides, respectivamente (Dobros, Zawada & Paradowska, 2022).

De acuerdo con Bellavite (2023), los compuestos polifenólicos pueden proteger las células nerviosas sobre las principales enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, tales como la ansiedad, estrés y depresión, lo cual, su cuantificación en este tipo de investigaciones es de suma importancia.

4.5 Evaluación de la actividad ansiolítica

4.5.1 Equipo de medición “Plataforma agujereada”

4.5.1.1 Evaluación de control

La determinación de la actividad ansiolítica utilizando el equipo "Plataforma agujereada" es un método que no se había empleado anteriormente en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Ciencias. Con el propósito de validar su viabilidad, como un primer paso, se llevó a cabo la evaluación por duplicado del método con un grupo de ratones a lo largo de 5 días. Todas las evaluaciones se realizaron en el mismo intervalo horario (14:00-14:30) para mantener la variabilidad de datos dentro de un rango consistente, permitiendo así obtener resultados robustos para el estudio. Además, los resultados obtenidos fueron comparados con un método previamente validado, como el puente de cruz elevado (Moreno Avilés et al., 2018, p 11).

Tabla 4-7. Resultados de la primera evaluación de control de la plataforma agujereada

<i>Grupo</i>	<i>Fecha de evaluación</i>	<i>Tiempo de evaluación</i>	<i>Código</i>	<i>Concentración</i>	<i>Hundimientos</i>
Evaluación	13/11/2023	5 min.	<i>E-001</i>	No Dosificación	13
	14/11/2023	5 min.	<i>E-002</i>	No Dosificación	16
	15/11/2023	5 min.	<i>E-003</i>	No Dosificación	12
	16/11/2023	5 min.	<i>E-004</i>	No Dosificación	14
	17/11/2023	5 min.	<i>E-005</i>	No Dosificación	11

Nota: cada sujeto experimental fue nombrado con un código específico.

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

Tabla 4-8. Resultados de la segunda evaluación de control de la plataforma agujereada

<i>Grupo</i>	<i>Fecha de evaluación</i>	<i>Tiempo de evaluación</i>	<i>Código</i>	<i>Concentración</i>	<i>Hundimientos</i>
Evaluación	20/11/2023	5 min.	<i>E-001</i>	No Dosificación	15
	21/11/2023	5 min.	<i>E-002</i>	No Dosificación	12
	22/11/2023	5 min.	<i>E-003</i>	No Dosificación	13
	23/11/2023	5 min.	<i>E-004</i>	No Dosificación	15
	24/11/2023	5 min.	<i>E-005</i>	No Dosificación	10

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

La verificación realizada ha confirmado que el método cumple con las expectativas previstas, observándose que, en ausencia de estímulos, los ratones realizan inspecciones en cada uno de los agujeros presentes en la plataforma de manera similar sin que influya su “conocimiento” previo del equipo tras la primera evaluación. La colocación de la cabeza de los ratones en los orificios del dispositivo se considera un método idóneo para evaluar la ansiedad, dado que se registran resultados inversos en ratones que experimentan este estado (Ariza et al., 2011, p 8). Este hallazgo respalda la idoneidad del método para la evaluación del extracto en diversas concentraciones.

4.5.1.2 Efecto de *Spinacia oleracea* sobre actividad ansiolítica en Plataforma Agujereada

Tabla 4-9. Número de hundimientos de los ratones ante los tratamientos aplicados

<i>Grupo</i>	<i>Fecha de evaluación</i>	<i>Tiempo de evaluación</i>	<i>Código</i>	<i>Concentración</i>	<i>Hundimientos</i>	<i>Promedio</i>
<i>Blanco</i>	11/12/2023	5 min.	<i>B-001</i>	Propilenglicol 15%	17	19,2
	12/12/2023	5 min.	<i>B-002</i>	Propilenglicol 15%	21	
	13/12/2023	5 min.	<i>B-003</i>	Propilenglicol 15%	18	
	14/12/2023	5 min.	<i>B-004</i>	Propilenglicol 15%	15	
	15/12/2023	5 min.	<i>B-005</i>	Propilenglicol 15%	25	
<i>Control</i>	18/12/2023	5 min.	<i>C-001</i>	Clonazepam 1.25 mg	43	40,8
	18/12/2023	5 min.	<i>C-002</i>	Clonazepam 1.25 mg	40	
	19/12/2023	5 min.	<i>C-003</i>	Clonazepam 1.25 mg	39	
	19/12/2023	5 min.	<i>C-004</i>	Clonazepam 1.25 mg	41	
	20/12/2023	5 min.	<i>C-005</i>	Clonazepam 1.25 mg	41	
	20/12/2023	5 min.	<i>D-001</i>	Extracto 100mg/kg	18	

<i>D1-SO</i>	21/12/2023	5 min.	<i>D-002</i>	Extracto 100mg/kg	19	18,6
	21/12/2023	5 min.	<i>D-003</i>	Extracto 100mg/kg	17	
	22/12/2023	5 min.	<i>D-004</i>	Extracto 100mg/kg	19	
	22/12/2023	5 min.	<i>D-005</i>	Extracto 100mg/kg	20	
<i>D2-SO</i>	25/12/2023	5 min.	<i>F-001</i>	Extracto 200mg/kg	25	24,2
	25/12/2023	5 min.	<i>F-002</i>	Extracto 200mg/kg	23	
	26/12/2023	5 min.	<i>F-003</i>	Extracto 200mg/kg	25	
	26/12/2023	5 min.	<i>F-004</i>	Extracto 200mg/kg	22	
	27/12/2023	5 min.	<i>F-005</i>	Extracto 200mg/kg	26	
<i>D3-SO</i>	28/12/2023	5 min.	<i>G-001</i>	Extracto 300mg/kg	39	39,6
	29/12/2023	5 min.	<i>G-002</i>	Extracto 300mg/kg	40	
	29/12/2023	5 min.	<i>G-003</i>	Extracto 300mg/kg	41	
	30/12/2023	5 min.	<i>G-004</i>	Extracto 300mg/kg	40	
	30/12/2023	5 min.	<i>G-005</i>	Extracto 300mg/kg	38	

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

En la Tabla 4-9 se evidencia un patrón de comportamiento similar al observado en el número de entradas y el tiempo de permanencia. Es decir, a medida que aumenta la concentración del extracto, se observa una reducción en el estado ansiolítico del ratón, y comienza a explorar de manera casi similar a lo observado en el control positivo.

Tabla 4-10. Prueba ANOVA de cada tratamiento realizado en la prueba de plataforma agujereada.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Plataforma	Entre grupos	2387,440	4	596,860	131,467	0,000
	Dentro de grupos	90,800	20	4,540		
	Total	2478,240	24			

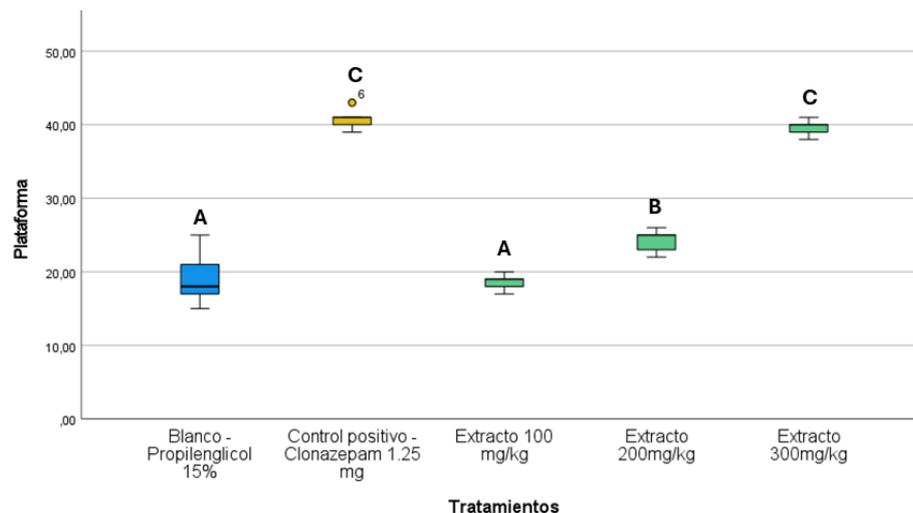
Realizado por: Guzmán, J., 2024.

Tabla 4-11. Prueba Post Hoc de Tuckey de cada tratamiento realizado en la prueba de plataforma agujereada.

Plataforma agujereada				
HSD Tukey ^a				
Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Extracto 100 mg/kg	5	18,6000		
Blanco - Propilenglicol 15%	5	19,2000		
Extracto 200mg/kg	5		24,2000	
Extracto 300mg/kg	5			39,6000
Control positivo - Clonazepam 1.25 mg	5			40,8000
Sig.		0,991	1,000	0,897

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

Para verificar de manera estadística si el aumento del número de hundimientos depende de la concentración del extracto, se aplicó la prueba estadística ANOVA seguida del análisis post hoc de Tukey. Se pudo confirmar que, efectivamente, al aumentar la concentración del extracto, el ratón retoma su comportamiento normal de manera significativa ($p=0,0001$), presentando un número de hundimientos similar ($n=39,6$) al observado en el control positivo ($n=40,8$).



Nota. Efectos del extracto hidroalcohólico de *Spinacia oleracea* (100, 200, 300 mg/kg PC), clonazepam (1,25 mg/kg PC) y grupo blanco (propilenglicol 15%) sobre la inmersión de cabeza en agujeros en PA. Letras distintas representan grupos formados al aplicar la prueba ANOVA seguido de una prueba Post hoc Tukey.

Ilustración 4-9. Número de hundimientos por cada tratamiento en plataforma agujereada.

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

La ilustración 4-9 muestra los efectos de *Spinacia oleracea* sobre el número de hundimientos por cada tratamiento aplicado. La administración del extracto hidroalcohólico de *Spinacia oleracea* en dosis de 300 mg/kg de peso corporal (PC) demostró actividad ansiolítica al aumentar el número de inmersión de la cabeza en los agujeros, siendo casi similar a lo generado por el control positivo.

A una dosis de 200 y 100 mg/kg PC, *Spinacia oleracea* no exhibió un efecto ansiolítico considerable, en comparación con el control positivo, de hecho, la dosis más baja exhibió valores semejantes al grupo blanco. Como era de esperar, el control positivo aumentó significativamente la inmersión de cabeza ($40,09 \pm 0,29$; $P < 0,5$) a comparación con el grupo blanco.

Varios estudios sobre plantas con propiedades ansiolíticas han destacado que la combinación de diversas pruebas comportamentales es fundamental para validar los datos y confirmar el efecto ansiolítico de los extractos vegetales. Por ejemplo, el estudio de Doukkali et al. (2015, p 11) reveló que la administración del extracto metanólico de hojas de *Urtica urens* a una dosis de 200 mg/kg PC en ratones suizos adultos aumentó la inclinación de la cabeza, respaldando la utilidad de la prueba del tablero perforado para modelar la ansiedad en animales.

Del mismo modo, el estudio de Apu et al. (2012, p 4) demostró en ratones albinos suizos que el extracto metanólico del fruto de *Jatropha gossypifolia* Linn, administrado a 200 mg/kg PC,

mostró un potencial ansiolítico, respaldado por varias pruebas comportamentales, como la prueba de plataforma agujerada y el laberinto de cruz elevada.

4.5.2 Efecto de *Spinacia oleracea* sobre actividad ansiolítica en Laberinto en Cruz elevado

Tabla 4-12. Número de entradas en brazos abiertos y brazos cerrados.

Grupo	Código	Concentración	Entradas en Brazos Abiertos	Entradas en Brazos Cerrados	Entradas en Brazos Abiertos (Promedio)	Entrada en Brazos Cerrados (Promedio)
<i>Blanco</i>	<i>B-001</i>	Propilenglicol 15%	2	20	2.4	19.8
	<i>B-002</i>	Propilenglicol 15%	1	18		
	<i>B-003</i>	Propilenglicol 15%	4	19		
	<i>B-004</i>	Propilenglicol 15%	3	21		
	<i>B-005</i>	Propilenglicol 15%	2	21		
<i>Control</i>	<i>C-001</i>	Clonazepam 1.25 mg	9	2	8.6	1.8
	<i>C-002</i>	Clonazepam 1.25 mg	8	2		
	<i>C-003</i>	Clonazepam 1.25 mg	8	1		
	<i>C-004</i>	Clonazepam 1.25 mg	10	3		
	<i>C-005</i>	Clonazepam 1.25 mg	8	1		
<i>D1-SO</i>	<i>D-001</i>	Extracto 100mg/kg	4	15	2.8	16.6
	<i>D-002</i>	Extracto 100mg/kg	3	17		
	<i>D-003</i>	Extracto 100mg/kg	2	18		
	<i>D-004</i>	Extracto 100mg/kg	3	18		
	<i>D-005</i>	Extracto 100mg/kg	2	15		
<i>D2-SO</i>	<i>F-001</i>	Extracto 200mg/kg	5	8	4.6	10.4
	<i>F-002</i>	Extracto 200mg/kg	8	14		
	<i>F-003</i>	Extracto 200mg/kg	3	10		
	<i>F-004</i>	Extracto 200mg/kg	3	11		
	<i>F-005</i>	Extracto 200mg/kg	4	9		
<i>D3-SO</i>	<i>G-001</i>	Extracto 300mg/kg	9	2	7.4	2.8
	<i>G-002</i>	Extracto 300mg/kg	8	3		
	<i>G-003</i>	Extracto 300mg/kg	7	3		
	<i>G-004</i>	Extracto 300mg/kg	7	4		
	<i>G-005</i>	Extracto 300mg/kg	6	2		

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

En la Tabla 4-12, se aprecia la variación en el tiempo de permanencia tanto en brazos abiertos como en brazos cerrados. Se pudo verificar que conforme aumenta la dosis del extracto, se incrementa el tiempo de permanencia de los ratones en brazos abiertos, mientras que se reduce el tiempo de permanencia en brazos cerrados.

Tabla 4-13. Tiempo de entradas en brazos abiertos y brazos cerrados.

Grupo	Código	Concentración	Minutos en Brazos Abiertos	Minutos en Brazos Cerrados	Minutos en Brazos Abiertos (Promedio)	Minutos en Brazos Cerrados (Promedio)
<i>Blanco</i>	<i>B-001</i>	Propilenglicol 15%	0,56614	1,98464	0,52368	2,58443
	<i>B-002</i>	Propilenglicol 15%	0,53114	2,95649		
	<i>B-003</i>	Propilenglicol 15%	0,47984	2,66151		
	<i>B-004</i>	Propilenglicol 15%	0,55164	3,08337		
	<i>B-005</i>	Propilenglicol 15%	0,48964	2,23614		
<i>Control</i>	<i>C-001</i>	Clonazepam 1.25 mg	1,42645	1,26639	1,49653	1,17012
	<i>C-002</i>	Clonazepam 1.25 mg	1,61768	1,24548		
	<i>C-003</i>	Clonazepam 1.25 mg	1,25669	1,32564		
	<i>C-004</i>	Clonazepam 1.25 mg	1,54871	0,98745		
	<i>C-005</i>	Clonazepam 1.25 mg	1,63312	1,02564		
<i>D1-SO</i>	<i>D-001</i>	Extracto 100mg/kg	0,72975	2,00210	0,76092	2,18771
	<i>D-002</i>	Extracto 100mg/kg	0,74031	1,60878		
	<i>D-003</i>	Extracto 100mg/kg	0,79640	2,46584		
	<i>D-004</i>	Extracto 100mg/kg	0,78694	2,96549		
	<i>D-005</i>	Extracto 100mg/kg	0,75120	1,89634		
<i>D2-SO</i>	<i>F-001</i>	Extracto 200mg/kg	1,22574	1,48554	1,26224	1,60291
	<i>F-002</i>	Extracto 200mg/kg	1,20831	1,65218		
	<i>F-003</i>	Extracto 200mg/kg	1,31458	1,58364		
	<i>F-004</i>	Extracto 200mg/kg	1,21598	1,80364		
	<i>F-005</i>	Extracto 200mg/kg	1,34658	1,48955		
<i>D3-SO</i>	<i>G-001</i>	Extracto 300mg/kg	1,35066	1,16116	1,42125	1,27657
	<i>G-002</i>	Extracto 300mg/kg	1,23614	1,18944		
	<i>G-003</i>	Extracto 300mg/kg	1,11347	1,36549		
	<i>G-004</i>	Extracto 300mg/kg	1,73614	1,47849		
	<i>G-005</i>	Extracto 300mg/kg	1,66984	1,18827		

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

De manera similar a lo observado en la Tabla 4-13, se nota que a medida que aumenta la concentración del extracto, también aumenta el tiempo de permanencia de los ratones en brazos abiertos, al mismo tiempo que disminuye el tiempo de permanencia en brazos cerrados.

Tabla 4-14. Prueba ANOVA de cada tratamiento realizado en la prueba de brazos abiertos y cerrados.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tiempo en brazos abierto	Entre grupos	3,668	4	0,917	43,793	0,000
	Dentro de grupos	0,419	20	0,021		
	Total	4,087	24			
Tiempo en brazos cerrados	Entre grupos	7,344	4	1,836	16,309	0,000
	Dentro de grupos	2,252	20	0,113		
	Total	9,596	24			
Entradas en brazos abiertos	Entre grupos	151,760	4	37,940	22,583	0,000
	Dentro de grupos	33,600	20	1,680		
	Total	185,360	24			
Entrada en brazos cerrados	Entre grupos	1292,240	4	323,060	150,963	0,000
	Dentro de grupos	42,800	20	2,140		
	Total	1335,040	24			

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

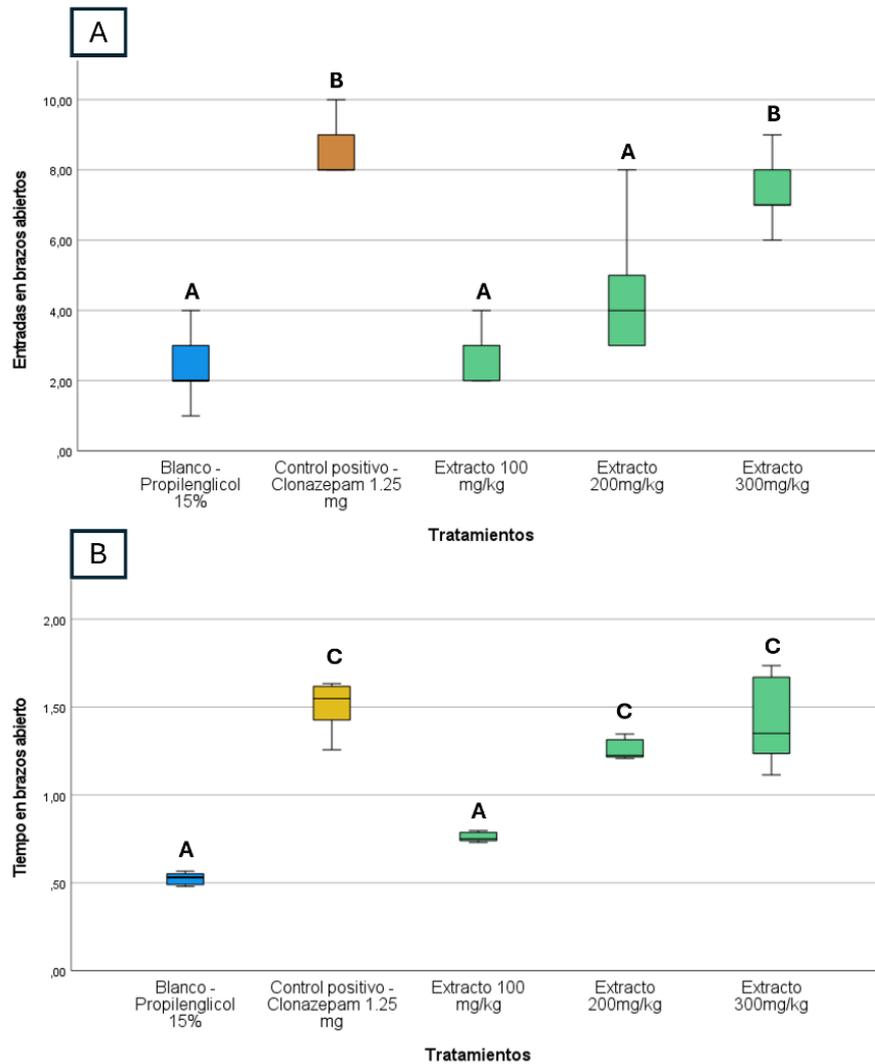
Tabla 4-15. Prueba Post Hoc de Tuckey de cada tratamiento realizado en la prueba de brazos abiertos

Entradas en brazos abiertos			Tiempo en brazos abierto		
HSD Tukey ^a			HSD Tukey ^a		
Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1			2

Blanco - Propilenglicol 15%	5	2,4000 A		Blanco - Propilenglicol 15%	5	0,5237 A	
Extracto 100 mg/kg	5	2,8000 A		Extracto 100 mg/kg	5	0,7609 A	
Extracto 200mg/kg	5	4,6000 A		Extracto 200mg/kg	5		1,2622 ^B
Extracto 300mg/kg	5		7,4000 ^B	Extracto 300mg/kg	5		1,4213 ^B
Control positivo - Clonazepam 1.25 mg	5		8,6000 ^B	Control positivo - Clonazepam 1.25 mg	5		1,4965 ^B
Sig.		0,092	0,596	Sig.		0,110	0,117

Realizado por: Guzmán J., 2024.

Con el objetivo de verificar las diferencias observadas tanto en el número de entradas como en la permanencia de los ratones en brazos abiertos y cerrados, se aplicó la prueba estadística ANOVA seguida del análisis post hoc de Tukey. De este modo, se pudo observar que, efectivamente, a medida que aumenta la concentración del extracto, se reduce significativamente ($p=0,0001$) el número de entradas en brazos cerrados y el tiempo de permanencia, llegando incluso a niveles casi similares a los observados en el control positivo.



Nota. Efectos del extracto hidroalcohólico de *Spinacia oleracea* (100, 200, 300 mg/kg PC), control positivo (clonazepam 1,25 mg/kg PC) y grupo blanco (propilenglicol 15%) sobre el número de entradas (A) y el tiempo transcurrido (B) en brazos abiertos en la prueba LCE. Letras distintas representan grupos formados al aplicar la prueba ANOVA seguido de una prueba Post hoc Tukey.

Ilustración 4-9. número de entradas y tiempo transcurrido de *Mus musculus* en brazos abiertos en laberinto de cruz elevado.

Realizado por: Guzmán, J., 2024.

La lustración 4-9 demuestra mediante el diagrama de caja y evaluando los parámetros de entradas y tiempo de permanencia en brazos cerrados y abiertos, que, la administración del extracto hidroalcohólico de *Spinacia oleracea* en dosis de 200 y 300 mg/kg de peso corporal (PC) efectivamente mostró actividad ansiolítica al incrementar el tiempo de permanencia y el número de entradas en brazos abiertos del equipo de manera directa a la concentración utilizada

A pesar de ello, solo únicamente se pudo evidenciar un incremento significativo en el tiempo de permanencia y el número de entradas en brazos abiertos en el grupo tratado con 300 mg/kg PC (ANOVA $p=0,0001$) (tabla 4-9 y 4-10).

Por el contrario, a una dosis de 200 mg/kg, *Spinacia oleracea* exhibió un efecto ansiolítico moderado, aunque no significativo en el número de entradas en los brazos abiertos, pero sí un incremento significativo en el tiempo de permanencia (ANOVA $p=0,0001$). En cambio, la dosis de 100 mg/kg no generó ningún efecto significativo en comparación con el control positivo.

Como era de esperar, el control positivo aumentó significativamente tanto el tiempo transcurrido ($1,53 \pm 1,29$ %; $P < 0,5$) como el número de entradas ($8,02 \pm 0,70$ %; $P < 0,5$) en los brazos abiertos en comparación con el grupo tratado con propilenglicol 15% (blanco) (tabla 4-10). Según el estudio llevado a cabo por Kaur et al. (2016, p 12), el extracto hidroalcohólico de *Spinacia oleracea* mostró efectos ansiolíticos prometedores a una dosis de 200 mg/kg de PC. Este hallazgo se sustentó en la evaluación de LCE, donde se observó un aumento significativo en el tiempo de permanencia y el porcentaje de entradas en los brazos abiertos, siendo comparable a los resultados obtenidos con diazepam (2 mg/kg PC).

Así mismo, de acuerdo con la investigación de Gorgi, Safakhah & Haghghi (2010, p 12), se observó que el extracto acuoso de la misma planta administrado a una dosis de 100 y 150 mg/kg PC, y evaluado en el LCE alivió el comportamiento asociado a la ansiedad en ratones. Ríos, Schinella & Moragrega (2022, p 9) indica en su investigación que los compuestos fenólicos, en particular los flavonoides, han sido vistos como agentes que regulan el sitio BZD de los receptores GABA-A, lo que puede resultar en efectos sedantes, ansiolíticos o anticonvulsivos.

A pesar de que no se identificó la presencia específica de los compuestos fenólicos dentro de la investigación, basado en la actividad ansiolítica observada, dicho comportamiento podría ser vinculado a la presencia de ácido cafeico, ácido ferúlico y rutina en el extracto hidroalcohólico (Montenegro-Landívar et al. 2021). Un estudio realizado por Bhuia et al. (2023) demostró que el ácido ferúlico muestra actividad ansiolítica cuando se trabaja en administraciones con concentraciones de 25, 50 y 75 mg/kg de peso corporal en ratones *Mus musculus*.

Como se mencionó previamente, la medición de la actividad ansiolítica se la puede realizar a través de varios métodos, como la plataforma agujereada, puente cruzado elevado, nado forzado y la caja de luz oscuridad. Aunque cada uno de estos métodos emplea enfoques distintos, es

crucial que los resultados sean consistentes para comparar la eficacia del método en la condición que se está analizando (Rejón-Orantes et al., 2010, p 9).

En este contexto, la investigación actual logró corroborar que el método de la plataforma agujereada arrojó resultados comparables a los obtenidos en el laberinto de cruz elevado. Este hallazgo adquiere una relevancia crucial, ya que se introdujo una prueba adicional, no comúnmente empleada, que permitió alcanzar resultados consistentes. Es importante señalar que los análisis estadísticos de cada prueba individual reflejaron resultados idénticos, indicando una dependencia de la dosis, siendo la concentración de 300 mg/kg la que manifestó el efecto más pronunciado.

CONCLUSIONES

- Se evaluó la actividad ansiolítica del extracto hidroalcohólico de hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) en ratones (*Mus musculus*) mediante la utilización del equipo electrónico de medición Laberinto en Cruz Elevado y la Plataforma Agujereada a tres concentraciones distintas (100 mg/kg, 200 mg/kg y 300 mg/kg), siendo la concentración mayor del estudio (300 mg/kg) la que presentó actividad ansiolítica en ambos equipos.
- A través de la aplicación del tamizaje fitoquímico, se ha evidenciado la presencia de diversos metabolitos secundarios en el extracto etéreo, acuoso y alcohólico. Entre ellos, se destacan fenoles, flavonoides, y alcaloides, a los cuales se les atribuyen diferentes actividades biológicas, actuando, por ejemplo, en el sistema nervioso central como alucinógeno o depresor del SNC así como estimulando la activación de los receptores GABA.
- Mediante un análisis espectrofotométrico, se logró determinar la presencia de una cantidad considerable de fenoles ($15,74 \pm 0,29$) y flavonoides ($18,77 \pm 0,312$) en el extracto hidroalcohólico de *Spinacia oleracea*. De acuerdo con diversas investigaciones, los compuestos polifenólicos pueden proteger las células nerviosas sobre las principales enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, tales como la ansiedad, estrés y depresión, lo cual, su cuantificación en este tipo de investigaciones es de suma importancia.
- La aplicación del tiempo y el número de entradas en brazos abiertos en la prueba del laberinto en cruz elevado, junto con la medición del número de hundimientos en la plataforma agujereada, permitió evaluar y confirmar el potencial ansiolítico del extracto hidroalcohólico de *Spinacia oleracea*, especialmente a una concentración de 300 mg/Kg, siendo esta, la cual mostró niveles equiparables a los encontrados en el control positivo (Clonazepam).

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un análisis de toxicidad de *Spinacia oleracea* para poder recolectar información de los riesgos que pueda ocasionar la administración prolongada del extracto hidroalcohólico de la planta a una dosis de 300 mg/kg.
- Se recomienda realizar un software que pueda facilitar el proceso de lectura de resultados dentro de la Plataforma Agujereada, que ayude a obtener resultados automatizados para el procesamiento de más evaluaciones dentro del mismo equipo.
- Se recomienda evaluar más parámetros dentro de la Plataforma Agujereada que puedan ser estandarizados para la correlación con la actividad ansiolítica como la velocidad media o el tiempo que el individuo introduce la cabeza dentro de los agujeros

BIBLIOGRAFÍA

1. **APU, Apurba Sarker, et al.** “Study of pharmacological activities of methanol extract of *Jatropha gossypifolia* fruits”. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy* [en línea], 2012, (Reino Unido) vol. 4 (1), pp 4-35 [Consulta: 30 enero 2024]. ISSN 0976-0105. DOI <https://doi.org/10.4103/0976-0105.109404>.
2. **ARCSA.** *Alerta sobre consumo indebido de Clonazepam en niños y adolescentes por reto en redes sociales.* [Consulta: 20 diciembre 2023]. Disponible en: <https://www.controlsanitario.gob.ec/alerta-sobre-consumo-indebido-de-clonazepam-en-ninos-y-adolescentes-por-reto-en-redes-sociales/>.
3. **ARDILA GÓMEZ, Sara, et al.** “Repercusiones de la COVID-19 en la Internación Psiquiátrica en América Latina y el Caribe”. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, [en línea] 2023, (Colombia) vol. 52 (1), pp 2-15, [Consulta : 21 diciembre 2023], ISSN 0034-7450. DOI 10.1016/J.RCP.2021.05.004.
4. **ARDILA-GÓMEZ, Sara, et al.** “Efectos sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico y fracciones de *Hygrophila tyttha* Leonard”. *Rev. Colombiana de Ciencias Químicas* [en línea] 2006, Colombia) vol. 3 (5), pp 7-21 [Consulta: 28 diciembre 2023], pp 3. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/1598/2268>.
5. **ARIZA, Sandra, et al.** “Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas”. *Revista Javeriana* [en línea] 2012 (Colombia) vol. 56 (5), pp 56-68 [Consulta: 27 febrero 2024]. ISSN 0121-4004. Disponible en: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/vnimedica/article/download/16039/12837>.
6. **AVELLO, Marcia & CISTERNAS, Isabel.** “Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile”. *Revista Médica Chile*, [en línea] 2010 (Chile) vol. 138 (1), pp 11-45, [Consulta: 27 febrero 2024] ISSN 0121-4004. Disponible en: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/vnimedica/article/download/16039/12837>.

7. **BAHIENSE, Jhéssica Benevides, et al.** “Potential anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of *Sambucus australis*”. *Pharmaceutical Biology* [en línea], 2017 (India) vol. 55 (1), pp 15-26 [Consulta: 20 diciembre 2023]. ISSN 17445116. DOI 10.1080/13880209.2017.1285324.
8. **BAILON-MOSCOSO, Natalia, et al.** “Medicinal plants of Ecuador: A review of plants with anticancer potential and their chemical composition”. *Medicinal Chemistry Research* [en línea], 2015 (España) vol. 24 (6), pp 1-23 [Consulta: 20 diciembre 2023], ISSN 15548120. DOI 10.1007/S00044-015-1335-7/METRICS.
9. **BALEKUNDRI, Amruta & MANNUR, Vinodhkumar.** “Quality control of the traditional herbs and herbal products: a review”. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* [en línea], 2020 (Estados Unidos) vol. 6 (1), pp 2-15, [Consulta: 30 enero 2024]. ISSN 2314-7253. DOI <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00091-5>.
10. **BANDELOW, Borwin, et al.** “Treatment of anxiety disorders”. *Dialogues in clinical neuroscience* [en línea], 2017, (Holanda) vol. 19 (2), pp 5-16 [Consulta: 21 diciembre 2023]. ISSN 1958-5969. DOI 10.31887/DCNS.2017.19.2/BBANDELOW.
11. **BELLAVITE, Paolo.** “Neuroprotective Potentials of Flavonoids: Experimental Studies and Mechanisms of Action”. *Antioxidants* [en línea], 2023, (España) vol. 12 (2), pp 4-26 [Consulta: 30 enero 2024]. ISSN 2076-3921. DOI <https://doi.org/10.3390/antiox12020280>.
12. **BENARROCH, Eduardo.** Receptores GABA B “Estructura, funciones e implicancias clínicas de la investigación neurocientífica”, *Antioxidants*, [en línea], 2012, (España) vol. 19 (2), pp 1-27 [Consulta: 21 diciembre 2023]. ISSN 1958-5969. DOI 10.31887/DCNS.2017.19.2/BBANDELOW.
13. **BHUIA, Md Shimul, et al.** “Anxiolytic-like Effects by trans-Ferulic Acid Possibly Occur through GABAergic Interaction Pathways”. *Pharmaceuticals* [en línea], 2023, (Holanda) vol. 16 (9), pp 4-16, [Consulta: 30 enero 2024]. ISSN 1424-8247. DOI <https://doi.org/10.3390/ph16091271>.
14. **CASTAÑEDA CAMPOS, Elsa Rosario & CASTAÑEDA CAMPOS, Willy German.** “Efecto sedante y ansiolítico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Solanum*

corneliomulleri J.F. Macbr. “Sandillón” en ratones”. (Trabajo de titulación) (Tercer nivel), Universidad de Norbert Wiener. Nueva York – Estados Unidos. 2020. pp. 1-86.

15. **DAI, Jin & MUMPER, Russell J.** “Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties”. *Molecules* [en línea], 2010, (Estados Unidos) vol. 15 (10), pp. 11-25 [Consulta: 30 enero 2024], ISSN 1420-3049. DOI <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>.
16. **DELGADO, Eloy Chacón, et al.** “Generalidades sobre el trastorno de ansiedad”. *Revista Cúpula*, [en línea], 2021, (Venezuela) vol. 16 (9), pp. 1-41 [Consulta: 30 enero 2024]. ISSN 1424-8247. DOI <https://doi.org/10.3390/ph16091271>.
17. **DINAKARAN, Sathis Kumar, et al.** “Profiling and determination of phenolic compounds in poly herbal formulations and their comparative evaluation”. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, [en línea], 2019, (China) vol. 9 (4), pp 1-27 [Consulta: 30 enero 2024]. ISSN 1452-65489. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.12.001>.
18. **DOBROS, Natalia, et al.** “Phytochemical Profile and Antioxidant Activity of Lavandula angustifolia and Lavandula x intermedia Cultivars Extracted with Different Methods. *Antioxidants* [en línea], 2022, (España) vol. 11 (4), pp. 10-29. [Consulta: 30 enero 2024]. ISSN 20763921. DOI <https://doi.org/10.3390/antiox11040711>.
19. **DOLORES, María & MARTÍNEZ, Cruz.** “Programa de Deshabitación de Benzodicepinas en Mayores Institucionalizados”. *Revista de Investigación y Educación en Ciencias de la Salud (RIECS)* [en línea], 2023, (Perú) vol. 8 (1), pp. 2-31. [Consulta: 21 diciembre 2023]. ISSN 2530-2787. DOI 10.37536/RIECS.2023.8.1.362.
20. **DOUKKALI, Zouhra, et al.** “Evaluation of anxiolytic activity of methanolic extract of *Urtica urens* in a mice model”. *Behavioral and Brain Functions* [en línea], 2015, (Reino Unido) vol. 11 (1), pp. 1-45 [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 17449081. DOI <https://doi.org/10.1186/s12993-015-0063-y>.
21. **DUBOVSKY, Steven L. & MARSHALL, Dori.** “Benzodiazepines Remain Important Therapeutic Options in Psychiatric Practice”. *Phycology* [en línea], 2022, (Alemania) vol.

8 (1), pp. 1-24. [Consulta: 21 diciembre 2023]. ISSN 2530-2787. DOI 10.37536/RIECS.2023.8.1.62.

22. **ERAZO, Norma.** “Evaluación del efecto nematocida de extractos alcohólicos de tres especies vegetales (*Ricinus comunis*, *Tagetes filifolia*, *Nicotiana tabacum*) en el cantón Riobamba. (Trabajo de titulación) (Tercer nivel). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Riobamba, Ecuador, 2018, pp. 1-97.
23. **ESTHER, Bach, et al.** “Características de comercialización de las principales plantas medicinales del mercado mayorista “La Parada” Lima en el periodo agosto 2019. (Trabajo de titulación) (Tercer nivel. Universidad Martín Ibarra. Chiclayo, Perú, 2018, pp. 1-97.
24. **EWAIS, Osama, et al.** “Administration of Ethanolic Extract of *Spinacia oleracea* Rich in Omega-3 Improves Oxidative Stress and Goblet Cells in Broiler Chickens Infected with *Eimeria tenella*”. *Molecules* [en línea], 2023, (Alemania) vol. 28 (18), pp. 1-36. [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 1420-3049. DOI <https://doi.org/10.3390/molecules28186621>.
25. **FERWINSON LARA FLORES, Edwin, et al.** “Control de Calidad de las Plantas Medicinales de la Farmacia Natural del CAMEC - Hospital III Chimbote”. *Revista Peruana de Medicina Integrativa* [en línea], 2020, (Perú) vol. 5 (2), [Consulta: 19 febrero 2024]. ISSN 2415-2692. DOI 10.26722/RPMI.2020.52.179.
26. **FIERASCU, Irina, et al.** “Genoprotective, antioxidant, antifungal and anti-inflammatory evaluation of hydroalcoholic extract of wild-growing *Juniperus communis* L. (Cupressaceae) native to Romanian southern sub-Carpathian hills”. *BMC Complementary and Alternative Medicine* [en línea], 2018, (Holanda) vol. 18 (1), pp. 1-35 [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 14726882. DOI <https://doi.org/10.1186/s12906-017-2066-8>.
27. **GHAZIZADEH, Javid, et al.** “*Melissa officinalis* L. hydro-alcoholic extract inhibits anxiety and depression through prevention of central oxidative stress and apoptosis”. *Experimental Physiology*, [en línea], 2020, (India) vol. 105 (4), [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 1469-445X. DOI <https://doi.org/10.1113/EP088254>.

28. **GIL, Rodrigo, et al.** *El cultivo de la espinaca (Spinacia oleracea L.) y su manejo fitosanitario en Colombia.* [Consulta: 31 enero 2024]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/13123>.
29. **GOETTER, Elizabeth, et al.** “Barriers to mental health treatment among individuals with social anxiety disorder and generalized anxiety disorder”. *Psychological services* [en línea], 2020, (Italia) vol. 17 (1), pp. 1-24 [Consulta: 21 diciembre 2023]. ISSN 1939-148X. DOI 10.1037/SER0000254.
30. **GÓMEZ, Claudia, et al.** “Modelos animales para el estudio de la ansiedad: Una aproximación crítica”. *Salud Mental*, [en línea] 2002, (Argentina) vol. 105 (4), pp 1-45. [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 1469-445X. DOI <https://doi.org/10.1113/EP088254>.
31. **GONZÁLEZ VILLALVA, Nelly Patricia.** Extracción y caracterización de los antioxidantes secundarios del romero (*Rosmarinus officinalis L.*) para promover la obtención y la aplicación de antioxidantes naturales sobre grasas y aceites. (Trabajo de titulación) (Tercer nivel). Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias de los alimentos, Carrera de Biotecnología. Ambato, Ecuador. 2018. pp. 1-86.
32. **GORGI, H. Miladi, et al.** “Anxiolytic effects of the aqueous extracts of spinach leaves in mice”. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*, [en línea] 2002, (India) vol. 105 (4), pp 9-31. [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 1469-445X. DOI <https://doi.org/10.1113/EP088254>.
33. **GUTIÉRREZ, Yamilet I, et al.** “Comparative Pharmacognosy, Chemical Profile and Antioxidant Activity of Extracts from *Phania matricarioides* (Spreng.) Griseb. Collected from Different Localities in Cuba”. *Plants* [en línea], 2018, (Holanda) vol. 7 (4), pp 14-38. [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 2223-7747. DOI <https://doi.org/10.3390/plants7040110>.
34. **GUZMAN VILLA, Ericka Mercedes & RODRIGUEZ VINUEZA, Valeria Isabel.** Análisis de la prescripción de antidepresivos y ansiolíticos, con relación a la pandemia COVID-19, en el Centro de Salud Nro.1 y el Centro de Salud Espoch- Lizarzaburu. (Trabajo de titulación) (Grado Tercer nivel). Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, Ecuador, 2022. pp 1-87 .

35. **HAMATI, Rami.** “Insights into the neurobiology of anxiety and a potential target for pharmacotherapy”. *Society for Neuroscience*. [en línea] 2018, (Francia) vol. 105 (4), pp. 1-36. [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 1469-445X. DOI <https://doi.org/10.1113/EP088254>.
36. **HIMANSHU, Dharmila, et al.** “A review of behavioral tests to evaluate different types of anxiety and anti-anxiety effects”. *Korean College of Neuropsychopharmacology*. [en línea] 2020, (Korea) vol. 105 (4), pp. 1-28. [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 1469-445X. DOI <https://doi.org/10.1113/EP088254>.
37. **HUARACA SALAZAR, Patricia Esthela.** “Estudio investigativo de la espinaca, cultivo, producción, explotación análisis de sus propiedades nutricionales y creación de nuevas recetas culinarias”, (Trabajo de titulación) (Grado Tercer nivel). Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, Ecuador, 2019. pp 1-65
38. **KADAM, Vladimir, et al.** “Determination of water soluble Ash values of some Medicinal Plants of Genus Sesbania”. *Journal of Pharmaceutical and Biological Research* [en línea], 2015, (Turkia) vol. 1 (1), pp 4-45 [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 1469-445X. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/260115364_Determination_of_water_soluble_Ash_values_of_some_Medicinal_Plants_of_Genus_Sesbania.
39. **KALIYAPERUMAL, Sowparthani & RADHIKA, Mohamred.** “Study of phytochemical analysis and antioxidant activity of Spinach oleracea L plant leaves”. *International Journal of Pharmacognosy*, [en línea] 2020, (India) vol. 105 (4), pp. 1-45. [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 1469-445X. DOI <https://doi.org/10.1113/EP088254>.
40. **KAMEI, Junzo, et al.** “Effects of nociceptin on the exploratory behavior of mice in the hole-board test”. *European Journal of Pharmacology* [en línea] 2004, (España) vol. 489 (2), pp. 1-45. [Consulta: 28 diciembre 2023]. ISSN 00142999. DOI 10.1016/j.ejphar.2003.12.020.
41. **KAUR, Divneet, et al.** “Comparative evaluation of anxiolytic effects of various extracts of oats (*Avena sativa*), rice bran (*Oryza sativa*) and spinach (*Spinacia oleracea*) in experimental animals”. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*

[en línea], 2016, (Suiza) vol. 7 (10), pp. 1-45. [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 2320-5148. DOI [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7\(10\).4110-16](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7(10).4110-16).

42. **KHAN, Alam & KHAN, Robert.** “Annals of Psychiatry and Mental Health Cite this article”. *Ann Psychiatry Ment Health*, [en línea], 2017, (Portugal) vol. 5 (1), pp. 12-35. [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 2374-0124. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11285468/>.
43. **KUMARI, Rajesh & KOTECHEA, Mita.** “A review on the Standardization of herbal medicines”. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, [en línea], 2016, (Suiza) vol. 7 (2), pp.1-54. [Consulta: 28 diciembre 2023]. ISSN 0975-9492. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11285467/>.
44. **LOURENÇO DA SILVA, Adrian & ELISABETSKY, Elidsabet.** “Interference of propylene glycol with the hole-board test”. *Brazilian journal of medical and biological research*. [en línea], 2001, (Brazil) vol. 34 (4), pp. 4-39. [Consulta: 28 diciembre 2023]. ISSN 0100-879X. DOI 10.1590/S0100-879X2001000400016.
45. **LUNA, Marlon, et al.** “Ansiedad y Depresión”. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* [en línea], 2001, (Venezuela) vol. 20 (2), pp. 1-25. [Consulta: 21 diciembre 2023]. ISSN 0798-0264. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642001000200002&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
46. **MONTENEGRO-LANDÍVAR, María Fernanda, et al.** “Recovery of added-value compounds from orange and spinach processing residues: Green extraction of phenolic compounds and evaluation of antioxidant activity”. *Antioxidants* [en línea], 2021, (España) vol. 10 (11), [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 20763921. DOI <https://doi.org/10.3390/antiox10111800>.
47. **MORENO AVILÉS, David, et al.** “Implementation of anxiety evaluation systems in laboratory mice using digital image processing”. *Maskay* [en línea], 2018, (Perú) vol. 8 (1), pp. 35-68. [Consulta: 2 enero 2024]. ISSN 1390-6712. DOI [10.24133/MASKAY.V8I1.773.67122018000100027&lng=es&nrm=iso&tlng=es](https://doi.org/10.24133/MASKAY.V8I1.773.67122018000100027&lng=es&nrm=iso&tlng=es).

48. **NAVARRO, Javier.** “Role of alpha subunits of the GABA A receptor in the regulation of aggressive behavior”. *Molecules* [en línea], 2012. (Reino Unido) vol. 4 (1), pp 1-29. [Consulta: 2 enero 2024]. ISSN 1390-6712. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/235223238_Papel_de_las_subunidades_a_del_receptor_GABA-A_en_la_regulacion_de_la_conducta.
49. **NIH.** Trastorno de pánico: Cuando el miedo agobia. [Consulta: 2 enero 2024]. Disponible en: http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1390-67122018000100027&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
50. **FERNÁNDEZ LÓPEZ, Odalis, et al.** “Manual para diagnóstico y tratamiento de trastornos ansiosos”. *Anxiety Disorders*. [en línea] 2012, (México) vol. 105 (4), pp. 1-19. [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 1469-445X. DOI <https://doi.org/10.1113/EP088254>.
51. **OMS.** COVID-19 y depresión en todo el mundo. Organización Panamericana de la Salud. [en línea] 202. [Consulta: 21 diciembre 2023]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/noticias/2-3-2022-pandemia-por-covid-19-provoca-aumento-25-prevalencia-ansiedad-depresion-todo>.
52. **OMS.** Salud mental y COVID19. datos iniciales sobre las repercusiones de la pandemia. 2022. Consulta: 21 diciembre 2023]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/noticias/2-3-2022-pandemia-por-covid-19-provoca-aumento-25-prevalencia-ansiedad-depresion-todo>.
53. **ONU.** Estado de la salud mental tras la pandemia del COVID-19 y progreso de la Iniciativa Especial para la Salud Mental (2019-2023), [Consulta: 21 diciembre 2023]. Disponible en: <https://www.un.org/es/cr%C3%B3nica-onu/estado-de-la-salud-mental-tras-la-pandemia-del-covid-19-y-progreso-de-la-iniciativa>.
54. **OROZCO, Wendy Navas, et al.** “Trastornos de ansiedad: revisión dirigida para atención primaria”. *Plants* [en línea], 2012, (Holanda) vol. 7 (4), pp 1-21. [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 2223-7747. DOI <https://doi.org/10.3390/plants7040110>.
55. **PACHACAMA, Sebastián.** Determinación de la actividad ansiolítica del extracto hidroalcohólico de las hojas de guayaba (*Psidium guajava*) en ratones (*Mus musculus*). (Trabajo de titulación) (Tercer nivel). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador, 2019. pp 1-35.

56. **PANDJAITAN, Nathan, et al.** “Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Spinach As Affected by Genetics and Maturation”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [en línea], 2005, (España) vol. 53 (22), pp. 1-18. [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 00218561. DOI <https://doi.org/10.1021/jf052077i>.
57. **PEZESHKI-NIA, Sogand, et al.** “Spinacia oleracea L. extract attenuates hippocampal expression of TNF- α and IL-1 β in rats exposed to chronic restraint stress”. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, [en línea] 2020, (Iran) vol. 34 (1), pp. 1-63. [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 22516840. DOI 10.34171/mjiri.34.10.
58. **PICHOT, Pierre, et al.** “Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales”. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* [en línea], 1995, (España) vol. 7 (10), pp. 1-535. [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 2320-5148. DOI [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7\(10\).4110-16](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7(10).4110-16).
59. **POLANCO, Lady Andrea, et al.** “Modelos animales: una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad”. *Suma Psicológica* [en línea], 2011, (Colombia) vol. 18 (2), pp. 1-77. [Consulta: 26 diciembre 2023]. ISSN 0121-4381. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-43812011000200011&lng=en&nrm=iso&tlng=es.
60. **PRATYUSHA, Sambangi.** “Phenolic Compounds in the Plant Development and Defense: An Overview”. *IntechOpen* [en línea], 2011, (Estados Unidos) vol. 5 (2), pp. 1-77 [Consulta: 31 enero 2024]. DOI <https://doi.org/10.5772/intechopen.102873>.
61. **RAMAIYAN, Breetha, et al.** “Spinach (*Spinacia oleracea* L.)”. *Antioxidants in Vegetables and Nuts - Properties and Health Benefits* [en línea], 2020. (Estados Unidos) vol. 5 (2), pp. 1-77. [Consulta: 26 diciembre 2023]. DOI 10.1007/978-981-15-7470-2_8/COVER.
62. **RASHID, Sofia, et al.** “Microscopic investigations and pharmacognostic techniques used for the standardization of herbal drug *Nigella sativa* L”. *Microscopy Research and Technique* [en línea], 2018, (Grecia) vol. 81 (12), pp. 1-36. [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 1097-0029. DOI <https://doi.org/10.1002/jemt.23110>.

63. **REJÓN-ORANTES, Jose, et al.** “Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad”. *Journal of Pharma Sciences and Research*, [en línea], 2010, (Alemania) vol. 7 (2), pp. 1-45. [Consulta: 28 diciembre 2023]. ISSN 0975-9492. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11285467/>.
64. **RÍOS, José Luis, et al.** “Phenolics as GABAA Receptor Ligands: An Updated Review”. *Molecules* [en línea], 2022, (Reino unido) vol. 27 (6), pp. 15-46. [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 1420-3049. DOI <https://doi.org/10.3390/molecules27061770>.
65. **ROMERO-CERECERO, Ofelia, et al.** “Uso de plantas medicinales en pacientes con síntomas de ansiedad generalizada”. *Archivos Venezolanos de Farmacología*, [en línea] 2019, (Venezuela) vol. 7 (2), pp. 1-45. [Consulta: 21 diciembre 2023]. ISSN 2448-5667. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?>
66. **SAITOH, Akiyoshi, et al.** “Changes in emotional behavior of mice in the hole-board test after olfactory bulbectomy”. *Journal of pharmacological sciences* [en línea], 2006, (Italia) vol. 102 (4), pp. 1-27. [Consulta: 28 diciembre 2023]. ISSN 1347-8613. DOI 10.1254/JPHS.FP0060837. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17130673/>.
67. **SÁNCHEZ-VÉLEZ, Hernán & MORETA-HERRERA, Rodrigo.** “Fear and Anxiety of COVID-19, Stress and Health Perception. A Predictive Model in Ecuadorian Hospital Patients”. *Anales de Psicología*, [en línea], 2022, (Colombia) vol. 38 (3), pp. 11-32. [Consulta: 28 diciembre 2023], pp. 15. ISSN 16952294. DOI 10.6018/analesps.489761.
68. **SENGUPTA, Darias, et al.** “Zinc oxide photo-anode based chlorophyll sensitized solar cell”. *CSIR-Institute of Minerals and Materials Technology* [en línea], 2014, (Italia) vol. 38 (3), pp. 11-32. [Consulta: 31 enero 2024]. Disponible en: <https://img1.17img.cn/17img/files/202003/attachment/836718d1-6d8f-45b6-b33b-46f1f5809226.pdf>.
69. **SIERRA, Juan Carlos & ORTEGA, Virgilio.** “Ansiedad, angustia y estrés: tres conceptos a diferenciar”. *Journal of pharmacological sciences* [en línea], 2003, (Alemania) vol. 102 (4), pp.1-35. [Consulta: 28 diciembre 2023]. ISSN 1347-8613. DOI 10.1254/JPHS.FP0060837.

70. **SONAVANE, Garve., et al.** “Behavioural actions of *Myristica fragrans* seeds”. *Indian Journal of Pharmacology*, [en línea], 2001, (India) vol. 102 (40), pp. 1 -31. [Consulta: 28 diciembre 2023]. ISSN 1347-8613. DOI 10.1254/JPHS.FP0060837.
71. **SONKAMBLE, Mirias. & PANDHURE, Nahtan.** “The effect of drying technique on nutrients content of leafy vegetables”. *International Journal of Current Research* [en línea], 2017, (Korea) vol. 9 (11), pp. 1-21. [Consulta: 31 enero 2024]. ISSN 1347-8613. Disponible en: <https://www.journalcra.com/article/effect-drying-technique-nutrients-content-leafy-vegetables>.
72. **TAKEDA, Hiroshi, et al.** “Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice”. *European journal of pharmacology*, [en línea], 1998, (Italia) vol. 350 (1), pp 1-64 [Consulta: 28 diciembre 2023]. ISSN 0014-2999. DOI 10.1016/S0014-2999(98)00223-4.
73. **VECCHIA, Cristian, et al.** “*Sonchus oleraceus* L. Promotes Gastroprotection in Rodents via Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antisecretory Activities”. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, [en línea], 2022, (España) vol. 350 (1), pp. 6-54 [Consulta: 28 diciembre 2023]. ISSN 17414288. DOI <https://doi.org/10.1155/2022/7413231>.
74. **WANG, Hongting, et al.** “Advancing herbal medicine: enhancing product quality and safety through robust quality control practices”. *Frontiers in Pharmacology*, [en línea], 2023, (Holanda) vol. 14, pp 1-41. [Consulta: 28 diciembre 2023]. ISSN 16639812. DOI <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1265178>.
75. **YUNTA, Eduardo Rodríguez.** “Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas”. *Acta bioethica* [en línea] 2007, (Venezuela) vol. 13 (1), pp. 1-31 [Consulta: 20 diciembre 2023]. ISSN 1726-569X. DOI 10.4067/S1726-569X2007000100004.
76. **ZHANG, Junhua, et al.** “Quality of herbal medicines: Challenges and solutions”. *Complementary Therapies in Medicine*, [en línea], 2012, (Holanda) vol. 20 (2), pp. 1-31. [Consulta: 28 diciembre 2023]. ISSN 0965-2299. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2011.09.004>.

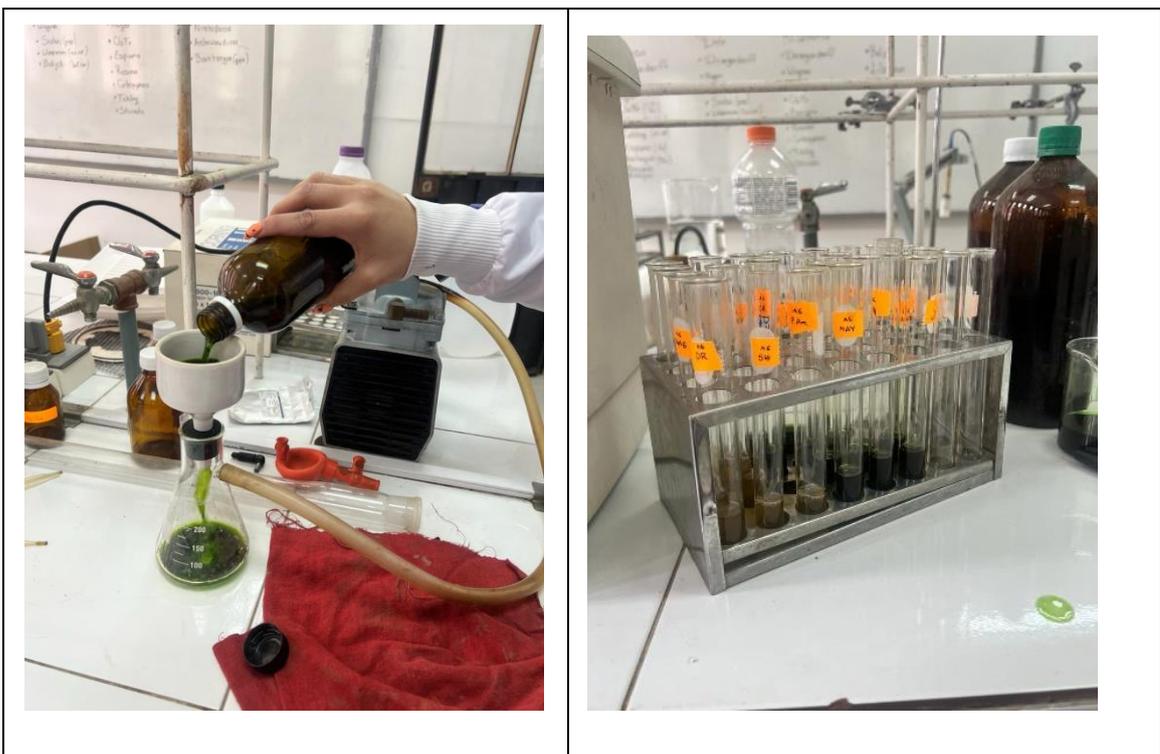


ANEXOS

ANEXO A: CONTROL DE CALIDAD DE LA HOJA SECA DE *Spinacia oleracea*.



ANEXO B: TAMIZAJE FITOQUÍMICO



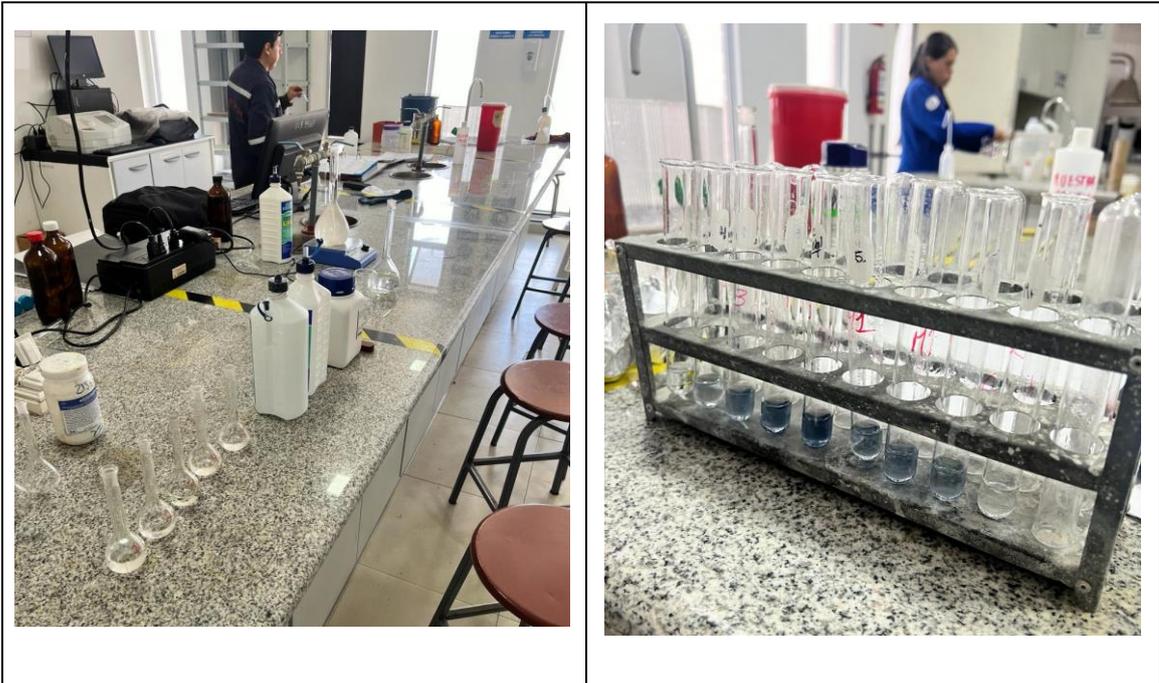
ANEXO C: CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Splintacia oleracea*



ANEXO D: CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO



ANEXO E: CUANTIFICACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES



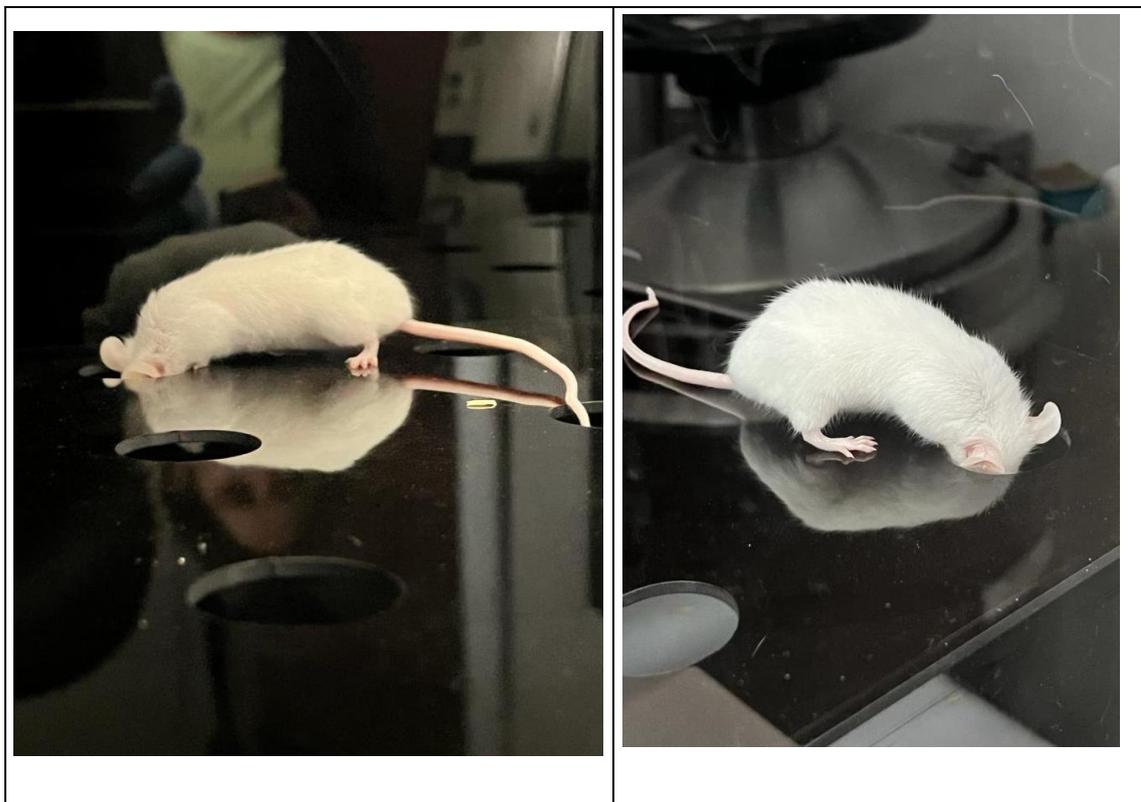
ANEXO F: PREPARACIÓN DEL EXTRACTO SECO DE *Spinacia oleracea*

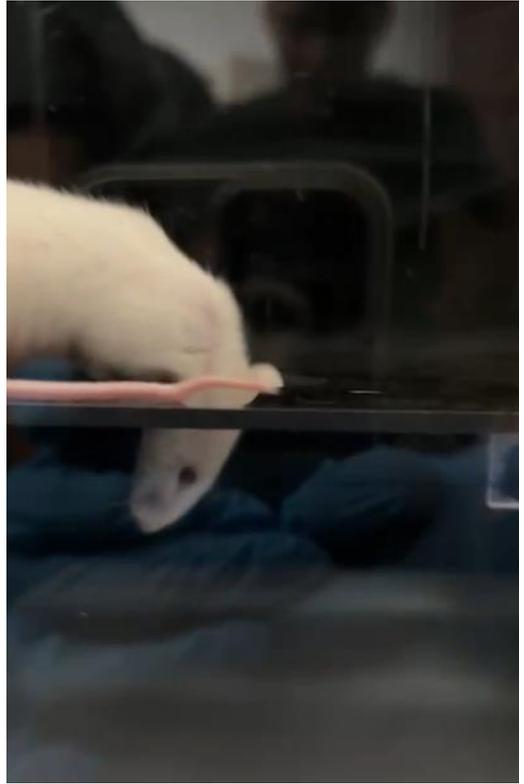


ANEXO G: ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN



ANEXO H: COMPORTAMIENTO DEL RATON (Mus musculus) EN LA PLATAFORMA AGUJERADA







ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE LA GUÍA PARA
NORMALIZACIÓN DE TRABAJOS DE FIN DE GRADO

Fecha de entrega: 12 / 06 / 2024

INFORMACIÓN DEL AUTOR
Nombres – Apellidos: Jose Luis Guzmán Guaño
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Bioquímica y Farmacia
Título a optar: Bioquímico Farmacéutico
 Bqf. Aída Adriana Miranda Barros Director del Trabajo de Integración Curricular
 Bqf. Gisela Alexandra Pilco Bonilla Asesor del Trabajo de Integración Curricular