

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD
DEL CUSCO**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA DE
LOS EXTRACTOS ETANÓLICO, FLAVONOÍDICO Y
FRACCIONES MAYORITARIAS FLAVONOÍDICAS
DE *Viola tricolor* L. “pensamiento”, USANDO LA
PRUEBA DE NADO FORZADO MODIFICADO.**

Tesis para Optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico

PRESENTADO POR:

Bach. Yon Aguilar Quispe

Bach. Roxana Cahuana Lloclla

ASESORA:

Dra. Carla Del Carpio Jiménez

CUSCO – PERÚ

2019

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme realizar esta tesis, brindándome la fortaleza y perseverancia para poder concretar uno de mis sueños por regalarme el milagro de la vida, además de su infinita bondad y amor.

A mi padre Mauro, quien con acciones ejemplares me enseñó a no desfallecer jamás y comprender que los sueños se logran a base de sacrificio y dedicación. Por ser el mejor papá, amigo, cómplice y el hombre más importante de mi vida.

A mi madre Julia, por hacer de mí una mujer con carácter, fuerza y principios, por todo el sacrificio y amor infinito que día a día entrega a su familia, este logro es más suyo que mío.

A mis hermanos Raúl y Cendy, por la exigencia y apoyo en cada proyecto, por comprender mi ausencia en momentos importantes, por demostrarme su preocupación y amor incondicional. Porque siempre caminaremos de la mano, en lo dulce y amargo.

A mi amigo Yon compañero de tesis, quien ha sido mi mano derecha durante todo este tiempo por creer siempre en mí y ser mi fuente de apoyo emocional, pero sobre todo, por estar a mi lado y por los buenos momentos que vivimos.

Roxana Cahuana Lloclla

DEDICATORIA

En primer lugar dedico esta tesis a Dios, por haberme acompañado y guiado todos los días de mi vida pero sobre todo por permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad.

A mi padres Aquilino y Bernarda, quienes son las personas más importantes en vida, que desde pequeño me han dado todo su amor y siempre me han guiado a lo largo de mi vida para lograr todos mis metas y llegar hasta donde estoy.

A mi hermano mayor Fredy, más que un hermano ser un segundo padre, por su comprensión y por apoyarme siempre en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, por todos los momentos de complicidad.

A Redy, por ser una persona especial, quien está siempre a mi lado en los peores momentos como también está en los buenos, por ser mi mejor amigo quien me apoya a lograr mis objetivos y que me anima a ser una mejor persona cada día.

A mi amiga y compañera de tesis Roxana, como amiga por ser una persona incondicional y por compartir momentos significativos en mi vida y como compañera de tesis por mostrarme su apoyo incondicional en momentos difíciles, y juntos recorrimos este camino y lo logramos.

A mis amigos(as) y todas las personas que de algún modo u otro están vinculadas con la trayectoria de mi vida.

Yon Aguilar Quispe

AGRADECIMIENTOS

A nuestra Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, por acogernos este tiempo en sus aulas y por habernos ayudado en la realización de este trabajo de investigación.

A nuestra Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, por brindarnos una educación de calidad al servicio de la población y la oportunidad de formarnos como profesionales, impartiéndonos sus enseñanzas para llevar a cabo nuestros objetivos personales y académico.

A nuestra asesora Dra. Carla del Carpio Jiménez, gracias por brindarnos su apoyo incondicional, por su tiempo, dedicación y los consejos en la elaboración del proyecto de la tesis y la tesis en sí, y por la confianza depositada en nosotros durante todo el proceso de ejecución.

A nuestros docentes quienes nos impartieron sus conocimientos y sus enseñanzas de vida a lo largo de nuestra etapa universitaria. Nuestra gratitud a quienes nos otorgaron su apoyo y cooperación incondicional para la realización del presente estudio.

A nuestras queridas familias por todo su apoyo incondicional que nos mostraron y por el esfuerzo realizado para que nosotros llegemos a concluir nuestra carrera profesional.

Finalmente, pero no con menor reconocimiento, queremos agradecer a cada una de nuestros amigos(as) que intervinieron, aportaron y acompañaron durante la formulación, ejecución del trabajo, quienes amablemente e incondicionalmente nos ayudaron, gracias por sus sugerencias y experiencias compartidas.

Yon y Roxana

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN	xiv

CAPÍTULO I GENERALIDADES

1.1. Planteamiento del problema	2
1.2. Formulación del problema.....	4
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. Objetivos generales.....	4
1.3.2. Objetivos específicos.....	4
1.4. Justificación	5
1.4.1. Prioridad:.....	5
1.4.2. Conocimiento:	5
1.4.3. Aplicabilidad:.....	6
1.5. Hipótesis.....	6

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO-CONCEPTUAL

2.1. Visión histórica.....	7
2.2. Estado de la cuestión.....	9
2.3. Antecedentes.....	10
2.3.1. Antecedentes locales	10
2.3.2. Antecedentes nacionales	11
2.3.3. Antecedentes internacionales.....	12
2.4. Bases teórico - Científicas	24
2.4.1. Aspectos botánicos de la planta en estudio: <i>Viola tricolor</i> L.....	24
2.4.2. Las plantas medicinales como fuentes de principios activos	26
2.4.3. Flavonoides.....	28
2.4.4. Salud mental y trastornos mentales.....	37
2.4.5. Depresión en el ser humano.....	38
2.4.6. Etiopatogenia de la depresión	39
2.4.7. Epidemiología de la depresión	41
2.4.8. Tratamientos actuales de la depresión	42

2.4.9. Clasificación de fármacos antidepresivos	43
2.4.10. Modelos experimentales de depresión	49
2.5. Definición de términos.....	56

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico	59
3.1.1. Muestra vegetal.....	59
3.1.2. Sujetos de experimentación	59
3.2. Criterios de selección.....	59
3.2.1. Criterios de selección de muestra vegetal	59
3.2.2. Criterios de selección de los sujetos de experimentación	59
3.3. Materiales e instrumentos de laboratorio	60
3.4. Diseño metodológico	61
3.4.1. Tipo de investigación.....	61
3.4.2. Diseño de investigación.....	61
3.4.3. Identificación de variables	65
3.4.4. Operacionalización de variables.....	66
3.4.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	74
3.4.6. Procesamiento de datos.....	74
3.5. Procedimientos de la investigación	76
3.5.1. Muestreo y preparación de la especie vegetal.....	77
3.5.2. Porcentaje de humedad	77
3.5.3. Porcentaje de rendimiento.....	78
3.5.4. Pruebas de solubilidad	78
3.5.5. Análisis Fitoquímico Cualitativo	78
3.6. Obtención del extracto etanólico	79
3.7. Obtención del extracto flavonoídico	79
3.7.1. Extracción por sonicación.....	79
3.7.2. Reacción de shinoda	80
3.8. Obtención de las fracciones flavonoídicas	80
3.8.1. Cromatografía en columna	80
3.8.2. Espectroscopía UV/Vis.....	82
3.9. Modelo experimental para determinar la actividad antidepresiva	82
3.9.1. Prueba de nado forzado modificado en ratones	82
3.9.2. Consideraciones éticas	83

CAPÍTULO IV ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1.	Determinación del porcentaje de humedad.....	86
4.2.	Determinación del porcentaje de rendimiento	87
4.3.	Pruebas de solubilidad.....	89
4.4.	Análisis Fitoquímico Cualitativo.....	91
4.5.	Identificación de flavonoides por espectroscopía UV/Vis	94
4.6.	Determinación de la actividad antidepresiva en el extracto etanólico	100
4.7.	Determinación de la actividad antidepresiva en el extracto flavonoídico	104
4.8.	Determinación de la actividad antidepresiva en la FR2	108
4.9.	Determinación de la actividad antidepresiva en la FR3	112
CONCLUSIONES		121
RECOMENDACIONES		123
BIBLIOGRAFÍA		124
ANEXOS		138

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Estructuras químicas de [1], [2] y [3].	13
Figura N° 2: Efecto de los componentes [1], [2] y [3] en el tiempo de inmovilidad en FST.	13
Figura N° 3: Cromatogramas de HPLC de extracto de heartsease y los espectros UV del pico (peak) 1 (violantina) y 2 (rutina).	22
Figura N° 4: Estructuras químicas de isoviolantina, violantina y rutina.	23
Figura N° 5: <i>Viola tricolor L.</i>	24
Figura N° 6: Estructura básica de los flavonoides.	28
Figura N° 7: Estructura esquelética básica de los flavonoides y sus clases.	29
Figura N° 8: Representación esquemática de movilidad e inmovilidad en la prueba de suspensión de la cola.	51
Figura N° 9: Representación esquemática de estrés por derrota social.	52
Figura N° 10: Representación esquemática de movilidad e inmovilidad en la prueba de nado forzado.....	53
Figura N° 11: Representación esquemática de inmovilidad, swimming y climbing en la prueba de nado forzado modificado.....	54
Figura N° 12: Representación esquemática del tiempo de inmovilidad, swimming y climbing de fluoxetina y reboxetina en la FST modificado.....	54
Figura N° 13: Espectro UV-Visible de la FR1.....	94
Figura N° 14: Espectro UV-Visible de la FR2.....	94

Figura N° 15: Espectro UV-Visible de la FR3.....	95
Figura N° 16: Espectro UV-Visible de la FR4.....	95
Figura N° 17: Espectro UV-Visible de la FR5.....	96
Figura N° 18: Espectro UV-Visible de la FR6.....	96
Figura N° 19: Espectro UV-Visible de la FR7.....	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Metabolitos secundarios en extracto crudo de <i>V. tricolor</i>	16
Tabla N° 2: Clasificación de los flavonoides.....	30
Tabla N° 3: Efectos farmacológicos de algunos flavonoides.	33
Tabla N° 4: Efectos de algunos flavonoides sobre el SNC.....	34
Tabla N° 5: Valores de absorción para las bandas I y II de los diferentes tipos de flavonoides.	37
Tabla N° 6: Efectos adversos asociados con fluoxetina y otros ISRS.	46
Tabla N° 7: Fármacos empleados en el tratamiento de la depresión.	48
Tabla N° 8: Antidepresivos atípicos y otras clases.....	49
Tabla N° 9: Criterios para la validez de un modelo animal de depresión.....	50
Tabla N° 10: Análisis Fitoquímico Cualitativo.....	79
Tabla N° 11: Gradiente de solventes utilizados en CC.....	81
Tabla N° 12: Porcentaje de humedad de las partes aéreas de <i>Viola tricolor</i> L. “pensamiento”.....	86
Tabla N° 13: Porcentaje de rendimiento de las partes aéreas de <i>Viola tricolor</i> L. “pensamiento”.....	87
Tabla N° 14: Resultados de la solubilidad del extracto etanólico al 70% y flavonoídico de <i>Viola tricolor</i> L. “pensamiento”.....	89
Tabla N° 15: Análisis Fitoquímico Cualitativo del extracto etanólico al 70% y flavonoídico de <i>Viola tricolor</i> L. “pensamiento”.....	91
Tabla N° 16: Tipo de flavonoides identificados por espectroscopía UV/Vis presentes en <i>Viola tricolor</i> L. “pensamiento”.....	97
Tabla N° 17: Reacción de shinoda en las diferentes fracciones obtenidas por CC de <i>Viola tricolor</i> L. “pensamiento”.....	97
Tabla N° 18: Estadísticos descriptivos del tiempo de inmovilidad, swimming y climbing de ratones tratados a diferentes dosis del extracto etanólico de <i>Viola tricolor</i> L. sometidos a la FST modificado.....	100
Tabla N° 19: Prueba de normalidad de los resultados del extracto etanólico.....	101
Tabla N° 20: ANOVA de los resultados del extracto etanólico.....	101

Tabla N° 21: Prueba de Duncan de los resultados del extracto etanólico	102
Tabla N° 22: Estadísticos descriptivos del tiempo de inmovilidad, swimming y climbing de ratones tratados a diferentes dosis del extracto flavonoídico de <i>Viola tricolor</i> L. sometidos a la FST modificado	104
Tabla N° 23: Prueba de normalidad de los resultados del extracto flavonoídico	105
Tabla N° 24: ANOVA de los resultados del extracto flavonoídico.....	105
Tabla N° 25: Prueba de Duncan de los resultados del extracto flavonoídico.....	106
Tabla N° 26: Estadísticos descriptivos del tiempo de inmovilidad, swimming y climbing de ratones tratados a diferentes dosis de la FR2 de <i>Viola tricolor</i> L. sometidos a la FST modificado	108
Tabla N° 27: Prueba de normalidad de los resultados de la FR2	109
Tabla N° 28: ANOVA de los resultados de la FR2	109
Tabla N° 29: Prueba de Duncan de los resultados de la FR2	110
Tabla N° 30: Estadísticos descriptivos del tiempo de inmovilidad, swimming y climbing de ratones tratados a diferentes dosis de la FR3 de <i>Viola tricolor</i> L. sometidos a la FST modificado	112
Tabla N° 31: Prueba de normalidad de los resultados de la FR3	113
Tabla N° 32: ANOVA de los resultados de la FR3	113
Tabla N° 33: Prueba de Duncan de los resultados de la FR3	114

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1: Tiempo de inmovilidad, swimming y climbing de ratones tratados a diferentes dosis del extracto etanólico de <i>Viola tricolor</i> L. sometidos a la FST modificado	103
Gráfico N° 2: Tiempo de inmovilidad, swimming y climbing de ratones tratados a diferentes dosis del extracto flavonoídico de <i>Viola tricolor</i> L. sometidos a la FST modificado	107
Gráfico N° 3: Tiempo de inmovilidad, swimming y climbing de ratones tratados a diferentes dosis de la Fracción 2 (FR2) de <i>Viola tricolor</i> L. sometidos a la FST modificado	111
Gráfico N° 4: Tiempo de inmovilidad, swimming y climbing de ratones tratados a diferentes dosis de la Fracción 3 (FR3) de <i>Viola tricolor</i> L. sometidos a la FST modificado	115

ÍNDICE DE FLUJOGRAMAS

Flujograma N° 1: Procedimientos de la investigación.....	76
--	----

Flujograma N° 2: Procedimiento de CC.	81
Flujograma N° 3: Procedimiento de la FST modificado en ratones.	84

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1: Certificado de determinación taxonómica de la especie vegetal en estudio emitido por el Herbario Vargas (CUZ).....	139
Anexo N° 2: Certificado sanitario de los animales de experimentación emitido por el Bioterio del Instituto Nacional de Salud.....	140
Anexo N° 3: Ficha para la recolección de datos para las pruebas de solubilidad.....	141
Anexo N° 4: Ficha para la recolección de datos del Análisis Fitoquímico Cualitativo	142
Anexo N° 5: Hoja de recolección de datos para la medición del tiempo de climbing, swimming e inmovilidad en la prueba de nado forzado modificado.....	145
Anexo N° 6: Hoja de datos de la resina Diaion® Hp-20	146
Anexo N° 7: Certificado de análisis de la resina Diaion® Hp-20 emitido por Supelco	149
Anexo N° 8: Procedimiento para preparar y usar columnas de resina Diaion® Hp-20 emitido por Supelco	150
Anexo N° 9: Procedimiento para el uso de animales de experimentación.....	151
Anexo N° 10: Archivo fotográfico	154

ABREVIATURAS

ATC:	Antidepresivo tricíclicos
CC:	Cromatografía en Columna
FR2:	Fracción flavonoídica 2
FR3:	Fracción flavonoídica 3
FST:	Forced Swimming Test, prueba de nado forzado
GABA:	Ácido Gamma – Aminobutírico
I.p.:	Vía intraperitoneal
IMAO:	Inhibidores de la monoaminoxidasa
ISRS:	Inhibidor Selectivo de la Recaptación de Serotonina
MAO:	Monoaminoxidasa
OMS:	Organización Mundial de la Salud
SNC:	Sistema Nervioso Central
TST:	Tail Suspension Test, prueba de suspensión de cola

RESUMEN

El **objetivo** del presente estudio fue determinar la actividad antidepresiva de los extractos etanólico, flavonoídico y fracciones flavonoídicas de *Viola tricolor* L. Para lo cual en el **método**, se utilizó un estudio experimental, mediante un diseño con postprueba únicamente, dosis repetidas y grupo control. Los extractos etanólico y flavonoídico de *V. tricolor* L. se obtuvieron por maceración y sonicación, respectivamente; las fracciones flavonoídicas fueron aisladas por Cromatografía en Columna, posteriormente se identificaron sus principales tipos de flavonoides por espectroscopia UV/Vis. La actividad antidepresiva se evaluó por la prueba de nado forzado modificado, con fluoxetina (20mg/kg) y solución salina (0.2ml/20g) como fármaco patrón y grupo control, respectivamente.

Siendo los **resultados** relevantes: Las partes aéreas presentan 86.08% de humedad. El rendimiento del extracto etanólico (18.84%), extracto flavonoídico (7.11%) y las dos fracciones mayoritarias fueron FR1 (14.19%) y FR2 (11.75%); pero como la FR1 es susceptible a contaminación microbiana fue difícil determinar la actividad antidepresiva, entonces se optó por la FR3 (8.20%). Los extractos etanólico y flavonoídico son solubles en solventes polares y su análisis fitoquímico cualitativo identificaron compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, glicósidos, azúcares reductores, taninos. Los principales tipos de flavonoides presentes en las fracciones flavonoídicas identificadas por espectroscopia UV/Vis fueron glicósidos de flavona y flavonol. En la prueba de nado forzado modificado los extractos etanólico (750, 500 y 250 mg/kg), flavonoídico (750 y 500 mg/kg), FR2 (360 mg/kg) y FR3 (360 y 90 mg/kg) redujeron significativamente alto el tiempo de inmovilidad, en relación al fármaco patrón y grupo control; además se presentó un incremento significativamente alto del tiempo de swimming con respecto al tiempo de climbing. En **conclusión**, los extractos etanólico, flavonoídico, FR2 y FR3 de *V. tricolor* L. presentan actividad antidepresiva en la prueba de nado forzado modificado mediante un posible mecanismo de acción serotoninérgico. Los metabolitos responsables serían flavonoides tipo glicósidos de flavona y flavonol.

Palabras clave: *Viola tricolor* L., prueba de nado forzado modificado, actividad antidepresiva, cromatografía en columna, UV/Vis, flavonoides.

ABSTRACT

The **objective** of the present study was to determine the antidepressant activity of ethanolic extract, flavonoidic extract and flavonoidic fractions of *Viola tricolor* L. For which an experimental study was used in the **method**, using a post-test design only, repeated doses and control group. Ethanolic and flavonoidic extracts of *V. tricolor* L. were obtained by maceration and sonication, respectively; Column Chromatography isolated the flavonoidic fractions, and then their main types of flavonoids were identified by UV/Vis spectroscopy. The antidepressant activity was evaluated by the modified forced swimming test, with fluoxetine (20mg/kg) and saline solution (0.2ml/20g) as standard drug and control group, respectively.

Being relevant **results**: The aerial parts have 86.08% humidity. The yield of ethanolic extract (18.84%), flavonoidic extract (7.11%) and the two majority fractions were FR1 (14.19%) and FR2 (11.75%); but as the FR1 is susceptible to microbial contamination, it was difficult to determine the antidepressant activity, so FR3 was chosen (8.20%). Ethanolic and flavonoidic extracts are soluble in polar solvents and their qualitative phytochemical analysis identified phenolic compounds, flavonoids, quinones, glycosides, reducing sugars, tannins. The main types of flavonoids present in flavonoidic fractions identified by UV/Vis spectroscopy were flavone and flavonol glycosides. In the modified forced swimming test ethanolic extract (750, 500 and 250 mg/kg), flavonoidic extract (750 and 500 mg/kg), FR2 (360 mg/kg) and FR3 (360 and 90 mg/kg) significantly reduced the immobility time, in relation to the standard drug and control group; there was also a significantly higher increase in swimming time compared to climbing time. In **conclusion**, ethanolic extract, flavonoidic extract, FR2 and FR3 of *V. tricolor* L. present antidepressant-like activity in the modified forced swimming test by a possible mechanism of serotonergic action. The metabolites responsible would be flavone and flavonol glycosides.

Key words: *Viola tricolor* L., modified forced swimming test, antidepressant-like activity, column chromatography, UV/Vis, flavonoids.

INTRODUCCIÓN

La salud mental es fundamental para la salud pública y hay muchas razones para que sea así: los trastornos mentales son frecuentes, ya que comprenden cinco de las diez causas principales de la carga de morbilidad en todo el mundo. Se prevé que el porcentaje de morbilidad mundial atribuible a los trastornos mentales y del comportamiento aumente del 12% en 1999 al 15% en el 2020 y que será mayor en los países en desarrollo, debido a factores relacionados al envejecimiento de la población y rápida urbanización. (1) (2)

La investigación y el desarrollo dedicados a los trastornos mentales durante las pasadas décadas, han transformado notablemente la práctica psiquiátrica, ofreciendo una mayor calidad de vida a millones de pacientes en todo el mundo. Gracias a los nuevos antidepresivos y antipsicóticos, con menos efectos secundarios y más rápida acción, las personas pueden retornar al trabajo, los pacientes son menos estigmatizados y las personas afectadas por los trastornos psicóticos pueden ser tratadas sin hospitalización, o con cortas permanencias en unidades de salud mental. (1)

Actualmente la medicina tradicional empleada, son la base para el desarrollo de la medicina moderna, y en algunas zonas rurales e indígenas, son el único recurso del que disponen a falta de instituciones médicas y recursos monetarios para la adquisición de medicina moderna. (3) Las plantas medicinales han atraído la atención de los investigadores que trabajan en este campo, ya que estas plantas se han utilizado durante mucho tiempo para tratar diferentes enfermedades, incluyendo trastornos psiquiátricos, y causan menos efectos adversos que las drogas sintéticas y químicas. (4)

Los flavonoides son compuestos que poseen una amplia gama de actividades farmacológicas entre las que destacan sus propiedades antioxidantes, también sobresalen sus propiedades como ansiolíticos, sedantes, antidepresivos y anticonvulsivos. (5)

En este contexto, el uso de plantas medicinales como alternativa en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas, en especial la depresión, ha tenido un gran auge en la última década. Entre las plantas utilizadas con más frecuencia

tenemos: Ginkgo biloba, lúpulo, pasionaria, romero, hierba de San Juan, valeriana, toronjil, etc.

En el presente estudio se evalúa la actividad antidepresiva de los extractos etanólico, flavonoídico y fracciones mayoritarias de las partes aéreas de *Viola tricolor* L. y tiene como objetivo validar científicamente el uso terapéutico del “pensamiento” en el control de la depresión y poder ser una alternativa en el tratamiento de la misma.

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La depresión es un trastorno mental frecuente en todo el mundo, y se calcula que afecta a más de 300 millones de personas. La depresión es distinta de las variaciones habituales del estado de ánimo y de las respuestas emocionales breves a los problemas de la vida cotidiana. Puede convertirse en un problema de salud serio, especialmente cuando es de larga duración e intensidad moderada a grave, y puede causar gran sufrimiento y alterar las actividades laborales, escolares y familiares. (6) La depresión, los hábitos tóxicos y la ansiedad se han identificado como algunos de los principales factores de riesgo en los intentos de suicidio. (7) La depresión se diferencia de la tristeza, que es una respuesta frecuente del ser humano frente a situaciones en que existe frustración u otras adversidades como problemas familiares, sociales o de otra índole; además de la tristeza persistente se le suma otros síntomas que afectan a la persona que la padece y a las personas que la rodean.

En nuestro país, la Oficina de Estadística e Informática del Instituto Nacional de Salud Mental “Honorio Delgado – Hideyo Noguchi”, presenta su publicación anual “Compendio Estadístico – 2017”, en el cual se establece que en segundo orden, la cantidad de atenciones brindada a personas con diagnóstico de episodio depresivo fue de 4422 personas de las cuales 1433 fueron varones y 2989 fueron mujeres. (8) Mientras que en su “Compendio Estadístico – 2016” se establece que entre los diagnósticos más frecuentes para los pacientes nuevos se encontraron que la depresión presentó 1832 casos. (9)

En el mercado actual, existen numerosos fármacos antidepresivos orientados todos a conseguir la mayor eficacia con la menor toxicidad lógicamente. Pero no hay ningún fármaco libre de problemas y hay que conocer las características de los mismos para poder realizar la elección más adecuada dependiendo de la eficacia, seguridad y tolerabilidad. (10) Aun así los ISRS como la fluoxetina presentan importantes reacciones adversas como anorexia, intolerancia gastrointestinal, trastornos en la eyaculación,

etc; los cuales limitan su aceptación y favorece la discontinuidad del tratamiento. (11)

En la actualidad se llevan a cabo cada día descubrimientos científicos que confirman el enorme potencial curativo que posee el mundo vegetal y que está transformando la fitoterapia en una práctica muy distinta a la de nuestros antepasados. (12) La frecuencia en la utilización de plantas en psiquiatría comienza a ser más evidente a mediados de los años noventa, cuando se realizó un estudio por Grunwald et al, en la población europea donde el consumo de plantas con algún efecto sedante y ansiolítico ocupa un 10% de las ventas. Otro estudio elaborado por el grupo de investigadores de Smet y Nolen W. en 1996, encontró que la prescripción de Hierba de San Juan fue más frecuente que la fluoxetina para la depresión. (13)

En los últimos años se ha realizado una intensa investigación sobre los flavonoides y sus acciones en el SNC, entre las que sobresalen sus propiedades como ansiolíticos, sedantes, antidepresivos y anticonvulsivos. Se ha demostrado que estos efectos son mediados principalmente por los receptores GABA, en particular los receptores GABA_A. (5)

Viola tricolor L., perteneciente a la familia Violaceae, conocida comúnmente como “pensamiento”, utilizada principalmente en la región Cusco como planta ornamental en sus principales plazas y avenidas; y en la medicina tradicional es considerada como remedio para tratar problemas relacionados con el sistema nervioso o como popularmente dicen para tratar los “nervios” o el “mal de corazón”, utilizando principalmente sus flores y tallos como infusión; a pesar de ello no es tomada en cuenta para tratar la depresión.

Con la finalidad de encontrar fuentes alternas de drogas antidepresivas naturales dentro de la familia Violaceae en la región Cusco, se propuso demostrar la actividad antidepresiva de los diferentes extractos etanólico, flavonoídico y fracciones mayoritarias flavonoídicas de las partes aéreas en floración de *Viola tricolor* L. en ratones albinos mediante la prueba de nado forzado (FST) que es un modelo animal descrito inicialmente por Porsolt y colaboradores, y que en la actualidad ha sufrido ciertas modificaciones para detectar con mayor eficacia no solo la actividad antidepresiva de cualquier

sustancia, sino también la de sugerir un posible mecanismo de acción de dicha actividad.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

✚ ¿Tendrán actividad antidepresiva los extractos etanólico, flavonoídico y fracciones mayoritarias flavonoídicas de *Viola tricolor* L. “pensamiento”, administrados por vía oral en la prueba de nado forzado modificado en ratones Balb/c/CNPB?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVOS GENERALES

- ❖ Determinar la actividad antidepresiva de los extractos etanólico, flavonoídico y fracciones mayoritarias flavonoídicas de *Viola tricolor* L. “pensamiento”, administrados por vía oral en la prueba de nado forzado modificado en ratones Balb/c/CNPB.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el porcentaje de humedad de las partes aéreas de *Viola tricolor* L. “pensamiento”.
2. Obtener los extractos etanólico y flavonoídico de *Viola tricolor* L. “pensamiento”.
3. Determinar el porcentaje de rendimiento, establecer la solubilidad y análisis fitoquímico cualitativo de los extractos etanólico y flavonoídico de *Viola tricolor* L. “pensamiento”.
4. Separar las fracciones mayoritarias flavonoídicas (2 fracciones) de *Viola tricolor* L. “pensamiento” por cromatografía en columna.
5. Identificar por espectroscopía UV/Vis los principales tipos de flavonoides presentes en las fracciones flavonoídicas de *Viola tricolor* L. “pensamiento”.
6. Determinar el tiempo de inmovilidad de los extractos etanólico, flavonoídico y fracciones flavonoídicas mayoritarias de *Viola tricolor* L. “pensamiento” en la prueba de nado forzado modificado, administrados por vía oral en ratones Balb/c/CNPB.

7. Evaluar los indicadores de depresión swimming y climbing en la prueba de nado forzado modificado en ratones Balb/c/CNPB tratados con los extractos etanólico, flavonoídico y fracciones mayoritarias flavonoídicas de *Viola tricolor* L. “pensamiento”.

1.4. JUSTIFICACIÓN

1.4.1. PRIORIDAD:

El gobierno Regional de Cusco y la UNSAAC con apoyo de instituciones públicas y privadas, en el documento “Agenda Regional de Investigación Cusco (ARIN-Cusco) al 2021”, destacan que dentro de las demandas de investigación identificadas en la dimensión social, en el área de Salud se encuentra la Salud mental: depresión, adicción y violencia. (14) Además la depresión, en el peor de los casos, puede llevar al suicidio. Cada año se suicidan cerca de 800 000 personas, y el suicidio es la segunda causa de muerte en el grupo etario de 15 a 29 años. (6) El doctor Yuri Cutipé Cárdenas, Director de Salud Mental del Ministerio de Salud (Minsa), señaló que: “De cada 3 casos de suicidio, dos se encuentran asociados con la depresión y el resto con problemas como violencia familiar, alcoholismo, esquizofrenia, problemas propios de la vida. Los grupos más afectados en el país son los jóvenes y adolescentes, adultos mayores y mujeres víctimas de maltrato”. (15) Por tal motivo, la depresión representa un problema vigente de salud pública, por lo cual es de prioridad tratar esta enfermedad, mediante el aprovechamiento de nuevas formas de tratamientos alternativos y efectivos.

1.4.2. CONOCIMIENTO:

En el Perú, la familia Violaceae presenta 12 géneros y 65 especies. (16) Las especies sudamericanas del género *Viola*, en especial *V. tricolor* L. es utilizada tradicionalmente para el control de la depresión, sin embargo no existen estudios que sustenten dicha actividad, por lo tanto este trabajo podría servir como fuente de información para

posteriores investigaciones, además de revalorar un recurso natural y que es de fácil accesibilidad en la región Cusco.

En la actualidad se sabe sobre las propiedades antioxidantes de los flavonoides, pero además de eso existe evidencia de distintos investigadores, sobre los efectos farmacológicos en el SNC, tal es el caso del flavonol rutina, que podría presentar actividad antidepresiva, por consiguiente, uno de los objetivos de este estudio es añadir un valor cognitivo al potencial farmacológico de los flavonoides, en especial los flavonoides presente en la especie *V. tricolor* L.

1.4.3. APLICABILIDAD:

En la bibliografía nacional e internacional se reporta un creciente uso de medicinas alternativas y/o complementarias, principalmente entre personas con trastornos de depresión o ansiedad. (17) Muchas plantas medicinales han mostrado un gran potencial presentando actividad antidepresiva, pero aún no han sido estudiadas como *V. tricolor* L., es por ello que su estudio podría ser muy útil en el tratamiento de la depresión y en la búsqueda de nuevos antidepresivos naturales, así poder obtener un beneficio para todas las personas que padecen este trastorno mental y su entorno próximo. Los extractos provenientes de *V. tricolor* L., podrían ser utilizados posteriormente como un tratamiento coadyuvante.

1.5. HIPÓTESIS

- ✚ Los extractos etanólico, flavonoídico y fracciones mayoritarias flavonoídicas de *Viola tricolor* L. “pensamiento”, administrados por vía oral, presentan actividad antidepresiva en la prueba de nado forzado modificado en ratones Balb/c/CNPB.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO-

CONCEPTUAL

2.1. VISIÓN HISTÓRICA

Lo que hoy llamamos depresión ha acompañado al ser humano durante toda su existencia, pero es en el siglo XX cuando eclosiona la industria farmacéutica y es entonces cuando los estudios contra la depresión se hacen

cada vez más intensos. Esta continua investigación lleva a la comprensión de los mecanismos farmacológicos, fisiológicos y bioquímicos de la depresión posibilitando el desarrollo de la teoría de las monoaminas. (18)

Hasta 1952, los principales recursos terapéuticos para el control y el alivio de situaciones de depresión mental eran la insulina, el electroshock, el litio y la psicoterapia. (19)

Los primeros fármacos antidepresivos fueron introducidos a finales de los años cincuenta, momento a partir del cual se ha podido establecer su efectividad. (20) Los IMAO se introdujeron en la terapéutica junto con los antidepresivos tricíclicos clásicos. El primer IMAO utilizado fue la iproniazida, fármaco utilizado en el tratamiento de la tuberculosis. Se observó que podía inducir una mejoría del estado de ánimo, lo que hizo que fuese utilizada en el tratamiento de pacientes depresivos. Fue éste el primer paso que condujo a la síntesis de los IMAO y a la generalización de su uso en la terapia de la enfermedad depresiva. (21)

En 1958, se comprobó que la imipramina carecía de actividad antipsicótica, pero mejoraba el estado de ánimo de los pacientes esquizofrénicos tratados, observación que condujo a que más tarde se pudiera demostrar que era un antidepresivo eficaz en pacientes depresivos. El estudio de su mecanismo de acción dio paso a la formulación de la hipótesis monoaminérgica y a la síntesis del resto de los antidepresivos tricíclicos, que han sido durante décadas el tratamiento de elección de la patología depresiva. (21)

En la década de los 70 aparecen los llamados antidepresivos atípicos, heterocíclicos o de segunda generación. Es a partir de la mitad de la década de los 80 que son desarrolladas nuevas familias de fármacos más selectivos y que supusieron una revolución en el tratamiento de la depresión. Primero fueron los ISRS y sucesivamente, surgieron los inhibidores reversibles de la monoaminoxidasa (RIMA), inhibidores de la recaptación de dopamina y noradrenalina (IRND), inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina (IRNS) llamados también antidepresivos duales, noradrenérgicos y serotoninérgicos específicos (NaSSA), inhibidores de la

recaptación de noradrenalina (IRN), y recientemente un agonista melatoninérgico. (22)

Por otro lado, existen múltiples plantas medicinales que han sido utilizadas de una u otra forma en psiquiatría; sin embargo, solo unas pocas poseen algún grado de evidencia científica. (23) Las hojas y flores de la especie *Viola odorata*, perteneciente a la familia Violaceae, se ha utilizado como antidepresivo en la medicina tradicional. (24) En 2012, Ghorbani et al., demostraron los efectos sedantes de *Viola tricolor*. (25)

2.2. ESTADO DE LA CUESTIÓN

En la actualidad *Viola tricolor* ha recobrado importancia, ya que muchos autores han demostrado interés en la propiedades que esta especie podría tener como es el caso de Harati et al., 2018, que investigaron el efecto del extracto hidroalcohólico de *Viola tricolor* L. sobre el comportamiento similar a la ansiedad en ratones sensibilizados con ovoalbúmina (OVA) y obtuvieron como resultado de que esta especie podría ser un buen remedio para tratar la ansiedad asociada con el asma. (26) En este mismo año Rahimi et al., demostraron que *V. tricolor* y sus fracciones de acetato de etilo y n-butanol poseían efectos anticonvulsivos, como lo confirmó la prolongación de la latencia a las primeras convulsiones tónico - clónicas generalizadas inducidos por pentilentetrazol (PTZ) y la disminución de la incidencia de la extensión tónica de la extremidad posterior inducida por una estimulación máxima de electroshock. (27)

La prueba de nado forzado desde que fue descrita y hasta la actualidad, ha sido la más utilizadas para detectar la actividad antidepresiva de los fármacos, aun cuando ha sido criticada por su carencia de similitud (facie) con la enfermedad depresiva. (28)

A pesar de que no existe estudios referentes a la actividad antidepresiva de la especie *V. tricolor* L., existe estudios que afirman que otras especies de la familia violaceae como *Viola odorata* tendrían este efecto, además de que esta actividad se debería a sus flavonoides, por lo que es mencionado en la presente investigación.

2.3. ANTECEDENTES

2.3.1. ANTECEDENTES LOCALES

Ccana G. Cribado de Actividad Antidepresiva en la prueba de natación forzada y toxicidad aguda en ratones Balb/c/CNPB de los extractos secos etanólicos de las partes aéreas en floración del *hypericum andinum*, *hypericum brevistylum*, *hypericum laricifolium* e *hypericum silenoides*. Cusco, Perú. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2011. (29)

Objetivo: Realizar un cribado de actividad de tipo antidepresivo de los extractos secos etanólicos obtenidos de las partes aéreas en floración del género *Hypericum* como *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium* e *H. silenoides*, administrados por vía oral en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la prueba de natación forzada.

Método: Se planteó un estudio experimental, mediante un diseño con postprueba únicamente, dosis única y grupo control. El tiempo de inmovilidad fue evaluado por la prueba de natación forzada.

Resultado: Se determinó un 35.64, 28.30, 24.60 y 23.14% de rendimiento de los extractos secos etanólicos obtenidos del *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium* e *H. silenoides*, respectivamente. Se evidenció la presencia de flavonoides, xantonas, derivados del ácido cafeico, xantonas y floroglucinoles diméricos dentro de los extractos preparados. Los valores de DL₅₀ de los extractos fueron mayores a 5000mg/kg. Se aisló fluoxetina clorhidrato a partir de capsulas comerciales con un rendimiento del 63% y una pureza del 93%. Se determinó una reducción máxima del tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada de la fluoxetina aislada a la dosis de 30mg/kg. Los extractos del *H. andinum* a las dosis de 250 y 500mg/kg, *H. brevistylum* a la dosis de 250mg/kg, e *H. silenoides* a la dosis de 500mg/kg redujeron significativamente el tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada.

Conclusión: Los extractos secos etanólico de las partes aéreas en floración del *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium* e *H. silenoides* presentan actividad de tipo antidepresivo sometidos a la prueba de natación forzada.

2.3.2. ANTECEDENTES NACIONALES

Laines G. Estudio del efecto Antidepresivo del extracto Hidroalcohólico de hojas de *Hypericum Laricifolium* (Chinchango) en ratones Albinos. Tesis de maestría. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2010. (30)

Objetivo: Comprobar el efecto antidepresivo del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Hypericum laricifolium* en ratones albinos.

Método: Se empleó el modelo de natación forzada modificada (FST) donde se sometió a todos los animales a una sesión de habituación que consistió en sumergirlos en una piscina cilíndrica durante 15 minutos; posteriormente fueron tratados cada 12 horas de la siguiente manera: Grupo 1 (n=13) vehículo 5ml/Kg, Grupo 2 (n=13) Diazepan 10mg/Kg, Grupo 3 (n=13) *H. laricifolium* 1% 100mg/Kg y Grupo 4 (n=13) *H. laricifolium* 10% 1000mg/Kg. Veinticuatro horas después se realizó la sesión de evaluación sometiéndolos a la experiencia anterior, durante 5 minutos. Se registró el tiempo de inmovilidad, swimming (natación) y climbing (escalado) para cada animal. Para la prueba de suspensión de la cola (TST) los animales fueron tratados cada 12hrs de la siguiente manera: Grupo 1 (n=11) vehículo 5 ml/Kg, Grupo 2 (n=11) Fluoxetina 10mg/Kg, Grupo 3 (n=11) *H. laricifolium* 1% 100mg/Kg, Grupo 4 (n=11) *H. laricifolium* 10% 1000mg/Kg. Veinticuatro horas más tarde los ratones fueron suspendidos individualmente por el tercio distal de la cola registrándose el tiempo de inmovilidad durante 6 minutos.

Resultados: En el FST los grupos *H. laricifolium* 1 % y 10% mostraron una reducción en el tiempo de inmovilidad en relación al grupo control 170 y 167 seg vs 231 seg respectivamente; el tiempo de swimming para el grupo *H. laricifolium* al 10% en relación al grupo control fue 112 vs 48 seg respectivamente; no observándose modificaciones en el tiempo de climbing. En la prueba de TST los animales con *H. laricifolium* al 10% y fluoxetina mostraron una significativa reducción del tiempo de inmovilidad en relación al grupo control 65 y 42 seg vs 108 segundos.

Conclusión: El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Hypericum laricifolium* presentó efecto antidepresivo en ratones observándose un mayor efecto a la concentración del 10%.

2.3.3. ANTECEDENTES INTERNACIONALES

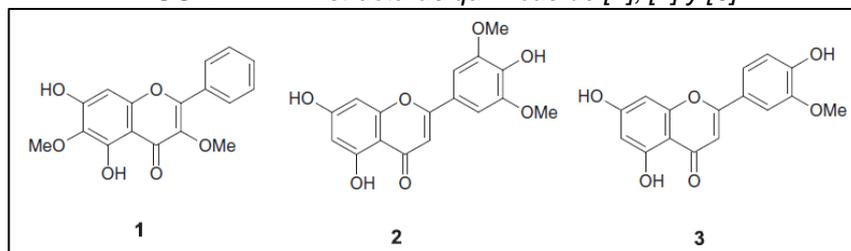
Karim N., Khan I., Abdelhalim A., Khan A., Halim S. Antidepressant potential of novel flavonoids derivatives from sweet violet (*Viola odorata* L): Pharmacological, biochemical and computational evidences for possible involvement of serotonergic mechanism. Fitoterapia. 2018 Mayo; 128: p. 148–161. (31)

Objetivo: Aislar fitoconstituyentes de *Viola odorata* L. e investigar los efectos antidepresivos de estos compuestos y su posible mecanismo de acción utilizando antagonistas del sistema serotoninérgico, dopaminérgico y adrenérgico.

Método: Para evaluar los efectos antidepresivos se utilizaron la TST y FST en ratones. Los ratones se dividieron en varios grupos y se administraron con un control, fluoxetina o compuestos de prueba 5,7-dihidroxi-3,6-dimetoxiflavona [1] 5,7,4'-trihidroxi-3',5' dimetoxi-flavona [2] y 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona [3] por vía i.p. Para experimentos que involucran la determinación de mecanismos, los ratones fueron tratados previamente con 5-HT, dopamina y antagonistas adrenérgicos. Los niveles de 5-HT en el cerebro se

determinaron siguiendo FST. Se llevaron a cabo estudios de acoplamiento molecular para determinar la afinidad de unión de los compuestos [1], [2] y [3] a los receptores serotoninérgicos.

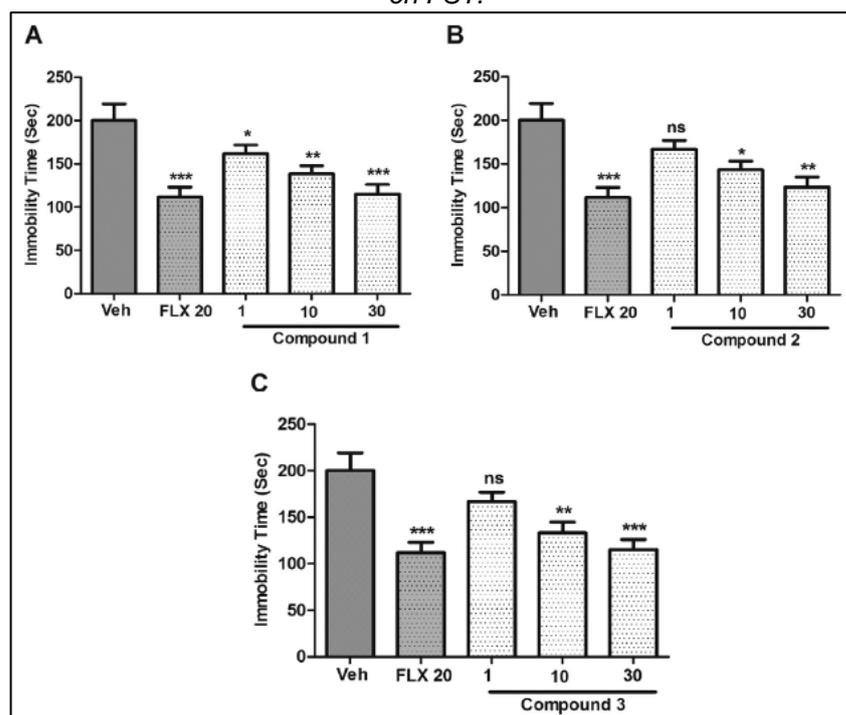
FIGURA N° 1: Estructuras químicas de [1], [2] y [3].



Fuente: Karim N. et al., 2018.

Resultados: Los resultados indicaron que los compuestos [1], [2] y [3] en dosis de 1 a 30 mg/kg, i.p., disminuyeron significativamente el tiempo de inmovilidad en la FST y la TST en ratones.

FIGURA N° 2: Efecto de los componentes [1], [2] y [3] en el tiempo de inmovilidad en FST.



Fuente: Karim N. et al., 2018.

La reducción del tiempo de inmovilidad se revirtió mediante el tratamiento previo de los ratones con pCPA (inhibidor de la síntesis de 5-HT) 100 mg/kg, i.p. y antagonistas del receptor 5-HT, incluidos WAY100635 (antagonista 5-HT_{1a}), ketanserina (un antagonista 5-HT_{2a}) y ondansetrón (antagonista 5-HT₃) pero no con prazosina

(antagonista α 1-adrenérgico) y SCH23390 (antagonista dopaminérgico D1) o antagonista haloperidol (D2 antagonista dopaminérgico). Además, en los ensayos neuroquímicos, los compuestos [1], [2] y [3] causaron un aumento significativo en el nivel de 5-HT en el tejido cerebral en comparación con el vehículo. Estos aumentos se revirtieron en los grupos de ratones tratados previamente con pCPA. Además, los resultados de acoplamiento molecular también muestran que los compuestos [1], [2] y [3] pueden interactuar con los receptores 5HT1A, 5HT2A y 5HT3, y son más específicos del subtipo de receptor 5HT3.

Conclusión: Los compuestos [1], [2] y [3] poseen efectos similares a los de los antidepresivos que podrían mediarse a través del sistema serotoninérgico.

Kedzierska E., Wach I. Using tests and models to assess antidepressant-like activity in rodents. Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. 2016 Marzo; 29(2): p. 61-65. (32)

Objetivo: Describir las pruebas y modelos con animales, en la evaluación de la actividad antidepresiva en roedores. Todos estos modelos están basados en dos principios: la interacción entre los antidepresores potenciales y las sustancias de referencia o las respuestas al estrés. Además, de discutir las ventajas e inconvenientes de cada modelo.

Método: Para evaluar estos modelos de depresión con animales se emplearon tres criterios principales: la validez aparente, validez de construcción y validez predictiva.

Resultados: La potenciación de la amfetamina, esta prueba no es específica, a veces da resultados falsos negativos o falsos positivos, al igual que la inversión de la acción de la reserpina.

FST, tiene varias ventajas como: la relativa simplicidad, los bajos costos y el hecho de que es una herramienta rápida y confiable para investigar la posible actividad antidepresiva (tiene una fuerte validez

predictiva). Desafortunadamente, la prueba tiene una pobre validez de constructo.

TST, una de las ventajas de esta prueba es que puede detectar un amplio espectro de antidepresivos, también es barato y poco sofisticado.

La principal ventaja de la indefensión aprendida como modelo de depresión es su muy fuerte validez predictiva.

El estrés leve crónico tiene ciertas desventajas, es más caro que los otros modelos y es difícil de llevar a cabo (demanda de espacio, necesita una duración prolongada y mano de obra intensiva).

El estrés por derrota social, la principal desventaja de este modelo es el hecho de que es muy absorbente en el tiempo (requiere 20 días). Otro inconveniente es que solo los roedores machos se pueden utilizar para este modelo.

Conclusión: La prueba de natación forzada (FST) y la prueba de suspensión de la cola (TST), son herramientas útiles que permiten la detección rápida y económica de compuestos con potencial actividad antidepresiva.

Piana M., Zadra M., Faccim de Brum T., Fernandes A., Boligon A., Correa R., et al. Analysis of Rutin in the Extract and Gel of *Viola tricolor*. Journal of Chromatographic Science. 2013 Octubre; 51: p. 406–411. (33)

Objetivo: Este estudio investiga sus fitoconstituyentes y capacidad antioxidante y valida un método para la cuantificación de rutina en el extracto crudo de las flores de *V. tricolor* y en el extracto incorporado en gel.

Método: Cromatografía líquida de alto rendimiento para la cuantificación de la rutina en el extracto y el gel. La cuantificación se realizó mediante la integración de los picos utilizando el método estándar externo. Los picos cromatográficos se confirmaron

comparando sus tiempos de retención y los espectros DAD (Diode-array detector)-UV con los de los patrones de referencia.

Resultados: Los resultados del análisis fitoquímico se presentan en la siguiente tabla:

TABLA N° 1: Metabolitos secundarios en extracto crudo de *V. tricolor*.

Metabolitos secundarios	Cantidad ± RSD (desviación estándar relativa)
Polifenoles	109.32 mg de ácido gálico equivalente/g de extracto ± 1.29
Flavonoides	99.40 mg de rutina equivalente/g de extracto ± 1.27
Taninos condensados	10.83 mg de catequina equivalente/g de extracto ± 0.49
Alcaloides	0.55 mg de alcaloides/g de extracto ± 0.79

Fuente: Piana M. et al, 2013.

Se encontró una capacidad antioxidante mucho mayor para el extracto [concentración de inhibición (IC50) de 16,00±0,78mg/ml] que el ácido ascórbico estándar (CI50 de 16,57±0,95mg/ml); estos excelentes resultados pueden atribuirse a las cantidades de polifenoles, flavonoides y taninos condensados.

Conclusión: *Viola tricolor* L., presenta una cantidad considerable de polifenoles y flavonoides: grandes cantidades de rutina contribuyen a la capacidad antioxidante de esta especie, taninos condensados, alcaloides y ácido salicílico también pueden ayudar en esta capacidad. También se encontró una capacidad antioxidante mucho mejor para el extracto de las flores de *V. tricolor* que el ácido ascórbico estándar.

Estrada R., Ubaldo D., Araujo A. Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. Salud Mental. 2012 Septiembre - Octubre; 35(5): p. 375-378. (5)

Objetivo: Describir los aspectos más relevantes de los flavonoides, además de revisar sus efectos sobre el SNC poniendo en evidencia su potencial farmacológico en trastornos mentales.

Método: Artículo descriptivo.

Resultados: Indica que en estos últimos 30 años se ha realizado una intensa investigación sobre sus acciones en el SNC, entre las que sobresalen sus propiedades como ansiolíticos, sedantes, antidepresivos y anticonvulsivos. Se ha demostrado que estos efectos son mediados principalmente por los receptores GABA, en particular los receptores GABA_A.

Conclusiones: Los flavonoides forman o deben formar parte de nuestra dieta diaria; por ello podemos promover su consumo para prevenir enfermedades.

Ghorbani A., Javadi N., Rakhshandeh H. Effect of *Viola tricolor* on pentobarbital-induced sleep in mice. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2012 Septiembre; 6(35): p. 2503-2509. (25)

Objetivo: Investigar el efecto hipnótico del extracto hidroalcohólico (HAE) de *V. tricolor* y sus fracciones. Además de probar la posible citotoxicidad de la planta contra una línea de células neuronales, PC12.

Método: El HAE se preparó mediante la extracción en etanol al 70% utilizando un aparato Soxhlet. Con la extracción disolvente-disolvente, el HAE se fraccionó adicionalmente a fracción de agua (WF), fracción de acetato de etilo (EAF) y fracción de N-butanol (NBF). El extracto (50, 75, 100, 150, 200, 300mg/kg, i.p.) y sus fracciones (200 mg/kg, i.p.) se administraron a ratones, 30 minutos antes de la inyección de pentobarbital (30 mg/kg, i.p.). Además, se evaluó la posible neurotoxicidad de la planta utilizando la línea de células neuronales PC12.

Resultado: El HAE, a 300 mg/kg, prolongó significativamente (34%) la duración del sueño inducido por pentobarbital. Del mismo modo, La fracción EAF aumentó significativamente (51%) la duración del sueño. Ninguna de las dosis HAE o las fracciones podrían cambiar significativamente el tiempo de latencia del sueño. El efecto sedante

de *V. tricolor* es acompañado sin toxicidad neuronal, excepto para concentraciones muy altas de EAF.

Conclusión: Los resultados sugieren que *V. tricolor* potencia la hipnosis inducida por pentobarbital en ratones y que el principal componente responsable de este efecto se encuentra más probablemente en EAF.

Schumacher J., Piana M., Forbrig A., Leitão A., Corrêa da Cruz R., Borba de Freitas R., et al. Doseamento de flavonóides em extrato liofilizado de *Viola tricolor* L. Revista Contexto & Saúde. 2011 Enero; 10(20): p. 907-910. (34)

Objetivo: Realizar la dosificación de los flavonoides presentes en el extracto de las flores de *Viola tricolor* L. a través del método descrito por Woisky y Salatino (1998) con pequeñas modificaciones.

Método: Se realizó una maceración en solución hidroalcohólica (3:7, v/v) por siete días con agitación diaria. El extracto fue filtrado en algodón y se evaporó por rotación con una temperatura inferior a 40°C, después de la extracción fue sometido a liofilización.

La determinación del contenido de flavonoides siguió el método descrito por Woisky y Salatino (1998) con pequeñas modificaciones, en las que 0.5 ml de la solución muestra (1000µg/ml) del extracto crudo de *Viola tricolor* L., se añadieron a 0.5 ml de AlCl₃ 2%. Después de 60 minutos se realizaron las lecturas en espectrofotómetro a 365nm utilizando curva de calibración de rutina como estándar, las lecturas fueron en triplicado.

Resultado: El contenido de flavonoides fue 111.17 miligramos de rutina por gramo de extracto.

Conclusión: De acuerdo con los resultados obtenidos, la especie *Viola tricolor* L. contiene una cantidad considerable de flavonoides.

Vukics V. Antioxidant Flavonoid Glycosides in *Viola tricolor* L. Tesis Postdoctoral. Budapest: Semmelweis University, School of Pharmaceutical Sciences; 2009. (35)

Objetivo: Determinar la actividad antioxidante y la composición química de *Viola Tricolor* L. mediante el desarrollo de un método de extracción adecuado, además del desarrollo de un protocolo de fraccionamiento adecuado. También compararon la composición química y la actividad antioxidante con otras especies de *Viola*.

Método: El protocolo de fraccionamiento se realizó por cromatografía en columna convencional. Para analizar la composición química de la fracción se realizó mediante metodologías cromatográficas y espectroscópicas, tales como HPLC, LC-MS y RMN. La capacidad antioxidante de las muestras se determinó mediante el ensayo TEAC y DPPH.

Resultados: Se desarrolló un método de extracción con aplicación de metanol, produciendo una fracción rica en constituyentes polares. El extracto metanólico enriquecido en componentes polares se separó mediante cromatografía en columna de Sephadex LH-20 convencional o poliamida.

El análisis por HPLC-UV de las fracciones sugirió que los dos componentes principales de flavonoides habían sido aislados con éxito. El principal flavonoide fue identificado por estudios de LC-MSn y RMN como violantina (6-C-glucosil-8-C-ramnosil-apigenina) y se sugirió que el segundo flavonoide principal fuera rutina (3-O-ramnoglucosil quercetina), además, otros catorce glucósidos de flavonoides fueron tentativamente identificados por LC-MSn. 3 flavonoides O-, 7C- y 3C, O-glicósidos con kaempferol, quercetina, isorhamnetina, crisoeriol, apigenina y luteolina agliconas. Además confirmaron la presencia de rutina, violantina, isoorientina y vicenina-2. Las muestras de *Viola tricolor* L. examinadas contenían $0.42 \pm 0.01\%$ de rutina.

La actividad antioxidante se determinó por medio de los ensayos de capacidad antioxidante equivalente de trolox (TEAC) y 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Con respecto a sus propiedades antioxidantes, se midió la mayor capacidad de donante de electrones con rutina aislada, y una fracción enriquecida con glucósidos de flavonoides mostró la actividad de donador de hidrógeno más alta. Además de un estudio comparativo de HPLC, se compararon los contenidos de antocianidina y flavonoides, así como las capacidades antioxidantes de diferentes colores de pétalos de pensamientos de jardín (*Viola x wittrockiana Gams.*) y *Viola tricolor* L. El componente principal de las flores podría ser la rutina, y como el componente principal para las hojas se sugirió como violantina.

Los contenidos de antocianidina y flavonoides de las muestras se cuantificaron por métodos espectroscópicos registrados en la Farmacopea Europea 5.0. El contenido de antocianidina más alta se midió en la flor violeta, las muestras de pensamiento blanco y amarillo mostraron el mayor contenido de flavonoides.

Conclusión: Se encontró una correlación significativa entre el contenido de flavonoides y la capacidad antioxidante de las muestras, apoyando la hipótesis de que la actividad antioxidante de *Viola tricolor* L. y de los pensamientos de jardín se debe principalmente a sus componentes flavonoídicos. Por otro lado, no se observó correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de antocianidina. Los pensamientos de jardín proporcionan una fuente valiosa de flavonoides mucho mayor que el *Viola tricolor* L.

Machado D., Bettio L., Cunha M., Santos A., Pizzolatti M., Brighente I., et al. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. European Journal of Pharmacology. 2008 Junio; 587(1-3): p. 163-168. (36)

Objetivo: Investigar el efecto antidepresivo del extracto etanólico de la parte aérea de *S. molle* en la prueba de natación forzada y la prueba de suspensión de cola en ratones. Además, se investigó el potencial antidepresivo de la rutina, un flavonoide aislado del extracto etanólico de esta planta y la influencia del pre-tratamiento con los inhibidores de la síntesis de serotonina o noradrenalina, el p-clorofenilalanina metil éster (PCPA) y α -metil-p- tirosina (AMPT), respectivamente.

Método: Prueba de natación forzada y la prueba de suspensión de cola para investigar el efecto antidepresivo.

Resultado: La administración del extracto etanólico produjo una reducción en el tiempo de inmovilidad en el ensayo de suspensión de la cola (rango de dosis 600-1000mg/kg, vía oral), pero no en la prueba de natación forzada. La administración de rutina redujo el tiempo de inmovilidad en la prueba de suspensión de la cola (0.3-3mg/kg, vía oral), pero no en la prueba de natación forzada, sin producir alteración en la actividad locomotora. Además, el pre-tratamiento de ratones con PCPA (100mg/kg, vía intraperitoneal, durante 4 días consecutivos) o AMPT (100mg/kg, vía intraperitoneal) evitó el efecto anti-inmóvil de la rutina (0.3mg/kg, vía oral) en la prueba de suspensión de la cola.

Conclusión: Los resultados indicaron que el efecto antidepresivo del extracto etanólico de *S. molle* en la prueba de suspensión de la cola puede depender de la presencia de rutina que probablemente ejerce su efecto antidepresivo aumentando la disponibilidad de serotonina y noradrenalina en la hendidura sináptica.

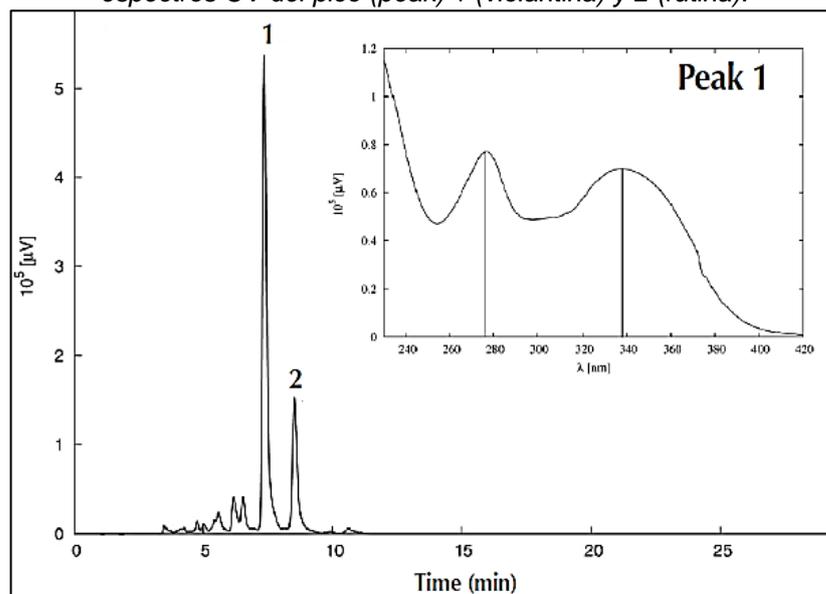
Vukics V., Hevesi B., Ringer T., Ludanyi K., Kery A., Bonn G., et al. Quantitative and Qualitative Investigation of the Main Flavonoids in Heartsease (*Viola tricolor* L.). Journal of Chromatographic Science. 2008 Febrero; 46(2): p. 97-101. (37)

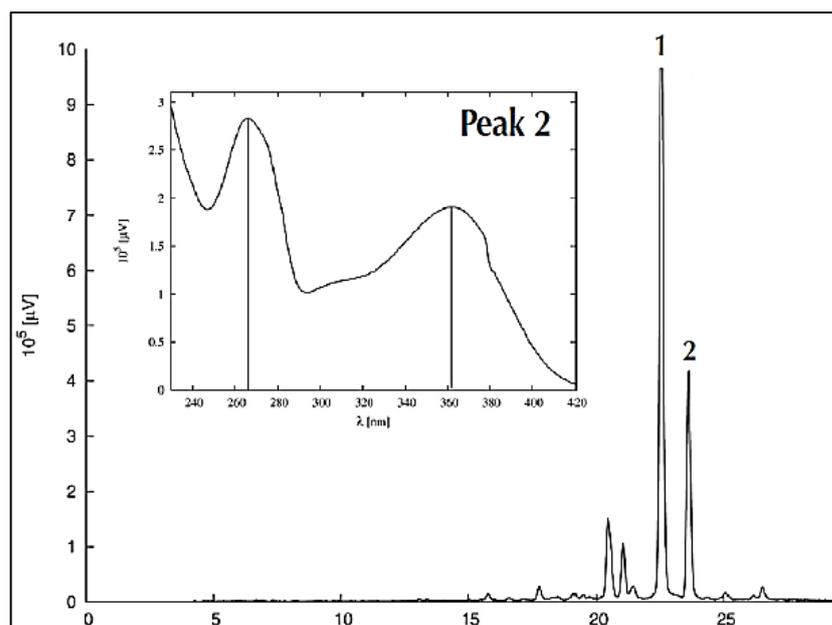
Objetivo: Este estudio presenta un informe de investigación sobre las características cuantitativas y cualitativas de los dos principales componentes de flavonoides.

Método: El método utilizado fue cromatografía líquida con ionización por electroespray espectrometría en espectrofotometría de masas en tándem (MS^n) para el análisis de flavonoides en heartsease (*Viola tricolor* L.).

Resultado: Los datos del estudio sugieren que los dos principales componentes de flavonoides son violantina (6- C glucosilo-8- C - rhamnosyl apigenina) y rutina (3- O -rutinosil quercetina). La identificación de rutina se confirmó mediante la comparación de su tiempo de retención, el espectro UV, masa molecular y el patrón de fragmentación con el patrón de referencia. El análisis cuantitativo de HPLC reveló que la muestra de heartsease, contenía $420 \pm 1,17\mu\text{g/g}$ de rutina.

FIGURA N° 3: Cromatogramas de HPLC de extracto de heartsease y los espectros UV del pico (peak) 1 (violantina) y 2 (rutina).

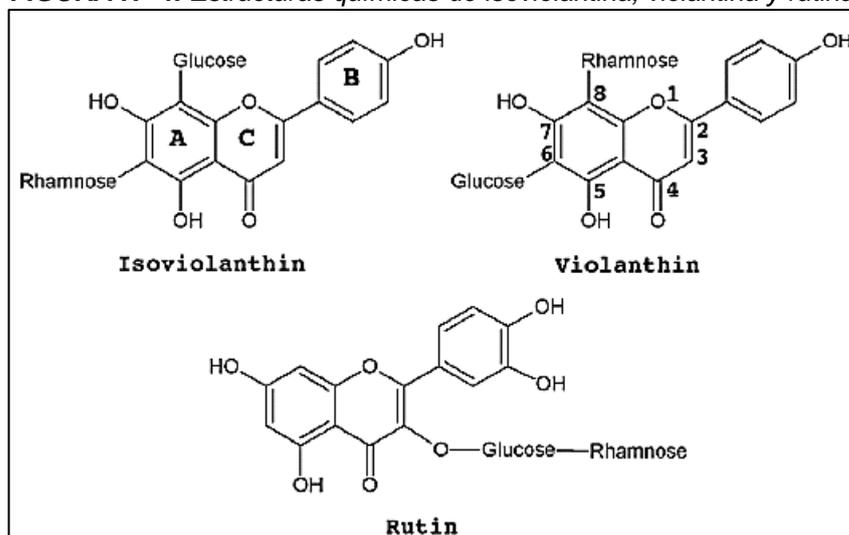




Fuente: Vukics V. et al, 2008.

Conclusión: Los dos principales componentes de flavonoides del extracto de metanol crudo de heartsease se analizaron mediante LC-MS regular y nanoLC-MSn. El análisis de datos de espectro de masas de varias etapas sugirió uno de los componentes principales como violantina. Se identificó el segundo componente principal como rutina.

FIGURA N° 4: Estructuras químicas de isoviolanthina, violantina y rutina.



Fuente: Vukics V. et al, 2008.

2.4. BASES TEÓRICO - CIENTÍFICAS

2.4.1. ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA PLANTA EN ESTUDIO: *Viola tricolor* L.

A. NOMBRES COMUNES:

Pensamiento, pensamiento salvaje, pensamiento silvestre, trinitaria, violeta azul, heartsease (ingles). (38)

B. POSICIÓN SISTEMÁTICA:

La determinación taxonómica de la especie en estudio fue realizado de acuerdo al sistema de clasificación del grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group – APG IV, 2016) por el Herbario Vargas (CUZ) de la UNSAAC (ANEXO N° 1).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malpighiales

Familia: Violaceae

Género: *Viola*

Especie: *Viola tricolor* L.

FIGURA N° 5: *Viola tricolor* L.



Fuente: Fonnegra R. y Jiménez S.L., 2007.

C. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:

Planta herbácea anual o bianual, casi rastrera, de 10 a 20cm de altura. Tallo semirrastrero o erecto, angulado, carnosos, anillado, muy ramificado. Hojas alternas; con estipulas relativamente grandes, varían desde ovaladas hasta lanceoladas amplias, dentadas, de lóbulos profundos y un segmento terminal ovalado. Flores axilares, sostenidas por largos pedúnculos ganchudos; corola formada por cinco pétalos con tres colores: azul, amarillo (crema o naranja) y violeta (purpura claro); o combinación de los tres colores o amarillo claro con parches violeta; cuatro pétalos son más o menos erguidos y uno dirigido hacia abajo. Fruto capsula, oval. (38)

D. HÁBITAT Y CULTIVO:

Es originario de Europa, norte de África y regiones templadas de Asia y está adaptado en América. Medra en muchos hábitats, desde zonas herbosas y montañosas hasta lugares costeros y también se cultiva en jardines. Las partes aéreas se recolectan en verano (39). Se cultiva extensamente con fines ornamentales y medicinales. (38)

E. PARTES UTILIZADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL:

Partes aéreas con flores, o únicamente las flores. (38)

F. COMPOSICIÓN QUÍMICA:

Contiene ácido salicílico (0.06 a 0.3%) y derivados, como el salicilato de metilo y su correspondiente glucoarabinósido, llamado violotósido o violotusina, además de otros ácidos fenólicos como los ácidos trans-cafeíco, cis y trans-p-cumárico, gentísico, protocatéquico y otros. Es rica en mucilagos (15%), compuesto por glucosa, galactosa, arabinosa y ramnosa, así como 2.4 a 4.5% de taninos. Se han aislado diversos flavonoides: rutina, violantina, escoparina, saponarina y los C-heterósidos vitexina, saponaretina,

orientina, isoorientina, vicenina-2 y un nuevo flavonoide di-C-glucósido, la violarvensina. Otros componentes son los taninos (2 a 5%), antocianósidos y carotenoides como la violoxantina (una mezcla de 4 isómeros geométricos) y pequeñas cantidades de saponinas, ácido ascórbico y α -tocoferol. (38)

En el aceite esencial obtenido a partir de partes aéreas frescas de *V. tricolor* L. se identificaron 35 compuestos que representan el 97.76% del aceite total, como sigue: 8 sesquiterpenos, 17 alifáticos, 6 derivados de ácido shikímico y 4 monoterpenos. Los sesquiterpenos fueron el principal componente (59.27%), seguidos por alifáticos (29.81%), derivados del ácido shikímico (8.05%) y monoterpenos (0.30%). Los principales componentes volátiles encontrados fueron óxido de bisabolona (43.25%), trans- β -farneseno (4.01%) y óxido de bisabolol A y B (7.78% y 2.28%). (40)

G. USOS MEDICINALES:

Se emplea como emoliente, depurativo de la sangre y del cuerpo, diurético, calmante, sudorífico, emético, pectoral, tónico, antiinflamatorio, antirreumático, laxante; en el tratamiento de la bronquitis, las erupciones en la piel y eczemas; para facilitar la oxigenación de la sangre, disminuir la eliminación del yodo. (38)

En la herboristería occidental se usa como planta purificadora y se toma para afecciones de la piel como el eczema. En infusión es útil para lavar el prurito. Al ser expectorante, se usa para bronquitis y tos ferina. Por su acción diurética, es buena para el reumatismo, la cistitis y la dificultad para orinar. (39)

2.4.2. LAS PLANTAS MEDICINALES COMO FUENTES DE PRINCIPIOS ACTIVOS

En distintas regiones del mundo la gente ha usado durante muchos años hierbas medicinales para aliviar trastornos afectivos. La búsqueda de fármacos eficaces y seguros en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas a partir de plantas medicinales ha tenido

un gran auge en la última década. (41) (42) La acción preventiva o curativa de las plantas medicinales se debe a que contienen sustancias químicas que provocan un efecto fisiológico en el organismo humano. Estos compuestos son conocidos como principios activos y, generalmente, son producto del metabolismo secundario de la planta. Algunas de estas sustancias se utilizan como antibióticos o antisépticos, otros son sedantes, analgésicos o estimulantes del sistema nervioso, o tienen actividad neuromuscular o muscular, entre otros efectos. (43)

Tradicionalmente la medicina herbolaria no visualiza la enfermedad como la alteración de un órgano específico, sino que mira al cuerpo como la interacción entre una serie de funciones que den permanecer en equilibrio, y la pérdida de este equilibrio es lo que produce la enfermedad. En este sentido el uso de plantas medicinales corregiría este desequilibrio global y no apunta su acción en un órgano determinado. (13)

En la literatura científica se encuentra un gran número de reportes de plantas, pertenecientes a diferentes familias, que muestran tener algún efecto a nivel de sistema nervioso central, se han reportado efectos psicoanalépticos, psicolépticos, psicodislépticos. (44)

La mayoría de estos estudios científicos se basan en reportes obtenidos por la medicina tradicional de varias culturas, en donde desde hace miles de años se emplean plantas como recurso disponible para aliviar diversos padecimientos. En la actualidad se emplea un fitomedicamento elaborado con *Hypericum perforatum* (Hierba de San Juan) para el tratamiento de la depresión mediana a moderada. (45) Las diferentes propiedades etnofarmacéuticas de diversos extractos de plantas y sus efectos se esperan que sean más seguros y más económicos que los antidepresivos existentes. (46)

2.4.3. FLAVONOIDES

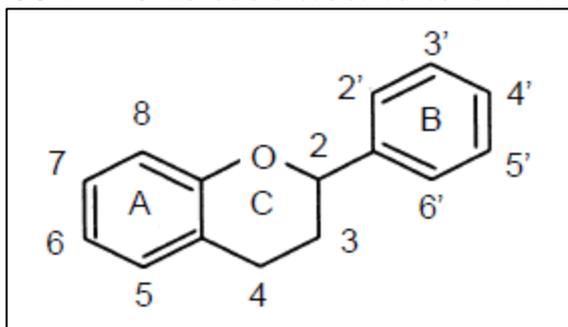
Los flavonoides son un grupo de sustancias que pertenecen a una clase de metabolitos secundarios de plantas naturales con estructuras fenólicas variables, se encuentran en frutas, vegetales, granos, corteza, raíces, tallos, flores, té y vino. (47) Esta gran familia de compuestos ha estado presente en la naturaleza durante más de mil millones de años, de manera que han actuado recíprocamente con el desarrollo de muchos organismos. (5)

Las tendencias actuales de las actividades de investigación y desarrollo sobre los flavonoides se relacionan con el aislamiento, la identificación, la caracterización y las funciones de los flavonoides y, finalmente, sus aplicaciones en los beneficios para la salud. (47)

A. ESTRUCTURA QUÍMICA

Los flavonoides son sustancias de bajo peso molecular producidas por casi todas las plantas vasculares. (5) Presentan un esqueleto común de difenilpiranos (C₆-C₃-C₆), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'. (48)

FIGURA N° 6: Estructura básica de los flavonoides.



Fuente: Martínez S. et al., 2002.

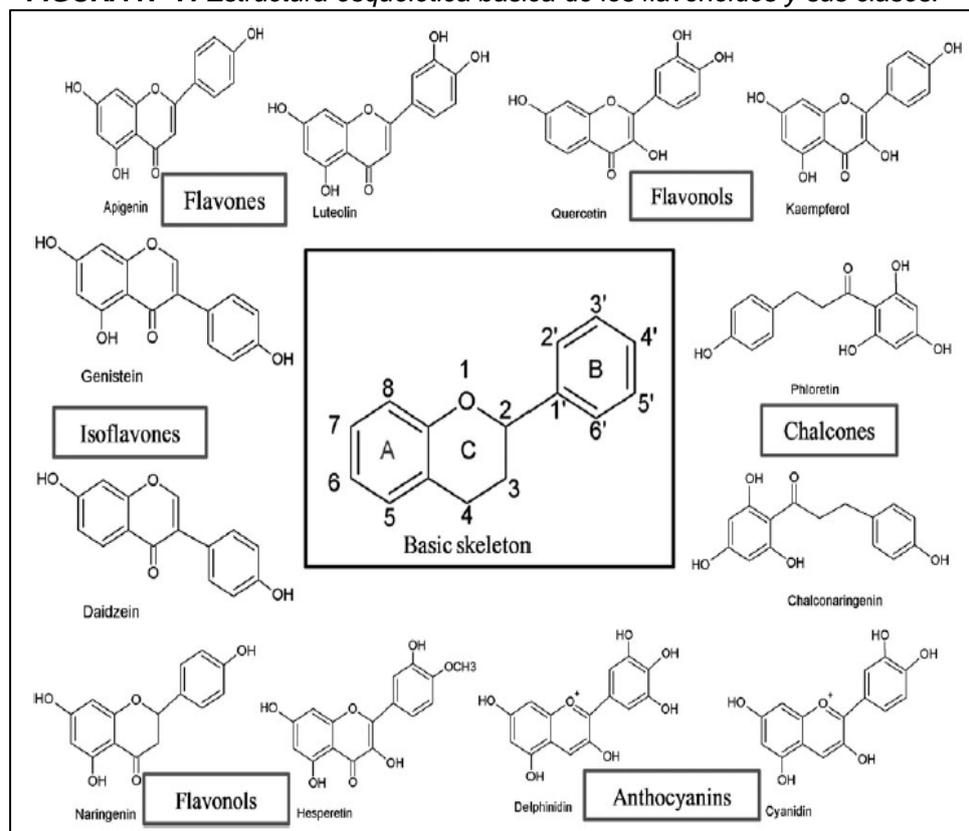
B. CLASIFICACIÓN DE LOS FLAVONOIDES

Se caracteriza por su diversidad estructural de tal manera que se han identificado más de 6000 de estos metabolitos secundarios cuyas propiedades biológicas dependen en gran medida de su estructura particular, es decir del tipo de sustituyentes, grupos

funcionales, grado de oxidación, formas diméricas, poliméricas, formas glicosidadas o libres, entre otras. (5)

Los flavonoides se pueden subdividir en diferentes subgrupos según el carbono del anillo C en el que se une el anillo B y el grado de insaturación y oxidación del anillo C. Los flavonoides en los que el anillo B está vinculado en la posición 3 del anillo C se denominan isoflavonas. Aquellos en los que el anillo B está vinculado en la posición 4 se denominan neoflavonoides, mientras que aquellos en los que el anillo B está vinculado en la posición 2 pueden subdividirse en varios subgrupos en función de las características estructurales del anillo C. Estos subgrupos son: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavononoles, flavanoles o catequinas, antocianinas y chalconas. (47)

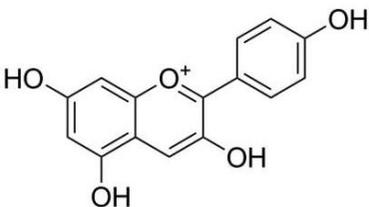
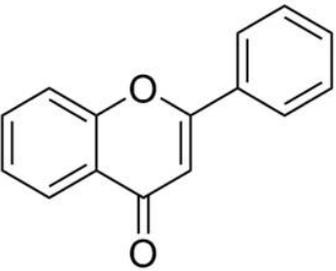
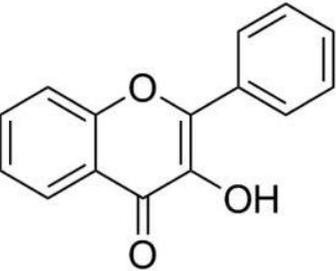
FIGURA N° 7: Estructura esquelética básica de los flavonoides y sus clases.

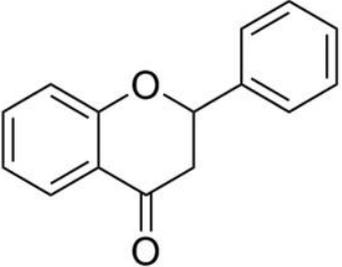
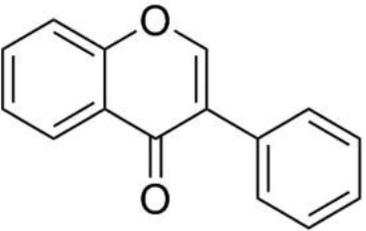
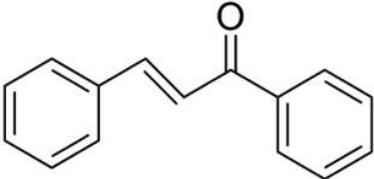


Fuente: Panche A.N. et al., 2016.

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

TABLA N° 2: Clasificación de los flavonoides.

Nombre	Descripción	Ejemplos	Fuentes naturales
<p>Antocianinas</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Tienen un grupo -OH en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C. • Pigmentos responsables de los colores en plantas, flores y frutas. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Cianidina ✓ Delfinidina ✓ Malvidina ✓ Pelargonidina ✓ Peonidina 	<p>Arándanos, grosellas negras, uvas rojas, uvas merlot, moras, frambuesas y fresas.</p>
<p>Flavonas</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Tienen un doble enlace entre las posiciones 2 y 3, una cetona en la posición 4 del anillo C. • Las flavonas de verduras y frutas tienen un grupo hidroxilo en la posición 5 del anillo A, mientras que la hidroxilación en otras posiciones, en su mayor parte en la posición 7 del anillo A o 3' y 4' del anillo B. • Presentes en las hojas, flores y frutas como glucósidos. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Luteolina ✓ Apigenina ✓ Tangeritina ✓ Tageretina ✓ Nobiletina ✓ Sinensetina 	<p>Apio, perejil, pimientos rojos, manzanilla, menta y ginkgo biloba.</p>
<p>Flavonoles</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Los flavonoles tienen un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C, que también puede estar glicosilado, con un grupo cetona. • Son bloques de construcción de proantocianinas. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Kaempferol ✓ Quercetina ✓ Miricetina ✓ Fisetina 	<p>Cebollas, col rizada, lechuga, tomates, manzanas, uvas y bayas, té y vino tinto.</p>

<p>Flavanonas</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • También llamadas dihidroflavonas, tienen el anillo C saturado; por lo tanto, a diferencia de las flavonas, el doble enlace entre las posiciones 2 y 3 está saturado. • Responsables del sabor amargo del jugo y la cáscara de los cítricos. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hesperitina ✓ Naringenina ✓ Eriodictiol 	<p>Cítricos como naranjas, limones y uvas.</p>
<p>Isoflavonoides</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Distribución limitada en el reino vegetal. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Genisteína ✓ Daidzeína 	<p>Soja y otras plantas leguminosas.</p>
<p>Chalconas</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Se caracterizan por la ausencia del anillo C de la estructura básica del esqueleto flavonoide, por lo tanto, también pueden denominarse flavonoides de cadena abierta. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Floridzina ✓ Arbutina ✓ Floretina ✓ Chalconaringenina 	<p>Tomates, peras, fresas, frutillas y ciertos productos de trigo.</p>

Fuente: Adaptado de Panche, A. N. et al., 2016.

Mientras que los flavonoides tienen un esqueleto de 2-fenilcromen-4-ona, los neoflavonoides tienen un esqueleto de 4-fenilcromen sin sustitución de grupo hidroxilo en la posición 2. La primera neoflavona aislada de fuentes naturales en 1951 fue calofillolide de semillas de *Calophyllum inophyllum*. (47)

Los flavonoles, también llamados dihidroflavonoles o catequinas, son los derivados 3-hidroxi de las flavanonas. Los flavanoles también se refieren a flavan-3-oles ya que el grupo hidroxilo está siempre unido a la posición 3 del anillo C. A diferencia de muchos flavonoides, no hay doble enlace entre las posiciones 2 y 3. Los flavanoles se encuentran en abundancia en los plátanos, manzanas, arándanos, melocotones y peras. (47)

A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, preferentemente a la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona (parte sin azúcares de la molécula flavonoide) o flavonoide respectivo. (49)

C. EFECTOS FARMACOLÓGICOS DE LOS FLAVONOIDES

Los flavonoides se consideran ahora como un componente indispensable en una variedad de aplicaciones nutracéuticas, farmacéuticas, medicinales y cosméticas, esto se atribuye a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticancerígenas, junto con su capacidad para modular la función de enzimas celulares clave; ciertos flavonoides modulan las actividades enzimáticas de las enzimas metabolizadoras del ácido araquidónico (AA), como la fosfolipasa A₂, la ciclooxigenasa (COX), la lipoxigenasa y la enzima productora de óxido nítrico, óxido nítrico sintasa. También se sabe que son potentes inhibidores de varias

enzimas, como la xantina oxidasa (XO). ciclooxigenasa (COX), lipoxigenasa y fosfoinositida 3-quinasa. (47) Además presentan una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antialérgica, antiinflamatorio y antiproliferativo. (50)

En el siguiente cuadro se describen los más documentados efectos, sin mencionar sus efectos sobre el SNC:

TABLA N° 3: Efectos farmacológicos de algunos flavonoides.

Efectos	Flavonoide
Antineoplásico	Quercetina, kaempferol, fisetina
Cardiotónicos	3-metil-quercetina
Disminuyen la fragilidad capilar	Rutina, quercetina, naringenina
Antitrombóticas	Tangeretina, hesperidina, rutina
Disminución del colesterol	Liquiritigenina
Protección y regeneración hepática	Silimarina, apigenina
Antiulcéricos	Kaemferol, quercetina
Antimicrobianos	Quercetina, baicalina
Antibacterial	Crisina, rutina
Antiviral	Crisoeriol
Antifúngica	Cloroflavonina, apigenina
Antiinflamatorios	Hesperidina, luteolina, quercetina
Analgésico	Hesperidina
Anticancerígeno	Quercetina

Fuente: Estrada R. et al., 2012.

D. EFECTOS DE LOS FLAVONOIDES SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La historia del descubrimiento de los efectos de los flavonoides sobre el SNC está ligada al descubrimiento de los receptores del GABA. Como parte de esta búsqueda se investigó también la presencia de moléculas afines a los receptores a GABA en alimentos de origen animal y vegetal, así como en plantas utilizadas en la etnomedicina de todo el mundo. (51)

En el siguiente cuadro se mencionan los efectos más documentados de los flavonoides sobre el SNC:

TABLA N° 4: Efectos de algunos flavonoides sobre el SNC.

Flavonoide	Ejemplo
Ansiolíticos	6-metilapigenina, wagonina, luteolina, 6-bromoflavanona
Antiepilépticos anticonvulsivos	Rutina, gossipina
Sedantes o inductores del sueño	Hesperidina, spinosina
Antinociceptivos	Miricetrina
Mejoran la memoria, el aprendizaje y el funcionamiento cognitivo	Rutina, nobiletina, quercetina, linarina
Antidepresivos	Quercetina, apigenina
Moduladores de la función neural	Nobiletina, hesperidina
Anti-neuroinflamatorios	Wogonina, luteolina, epicatequina, flavona
Neuroprotectores	Linarina, rutina

Fuente: Estrada R. et al., 2012.

Machado et al., describieron las propiedades de tipo antidepresivo de la rutina, un rutinósido de flavanona, en el extracto etanólico de la parte aérea de *Schinus molle* en la prueba de natación forzada y la prueba de suspensión de cola en ratones, determinaron que los efectos antidepresivos de la rutina fueron debidos a un incremento de la disponibilidad tanto de serotonina como de noradrenalina en la zona sináptica. (36)

Después de este estudio se han publicados los efectos antidepresivos de una gran variedad de flavonoides, mostrando así que también interactúan con otros sistemas de neurotransmisión. (5) El mecanismo de acción de estos efectos incluye la activación de los sistemas de neurotransmisores serotoninérgicos, dopaminérgicos, noradrenérgicos y GABAérgicos y un aumento en la producción de factores neuronales, incluido el factor neurotrófico derivado del cerebro y el factor de crecimiento nervioso. Además, se han informado alteraciones en la función del receptor de tropomiosina quinasa B y la actividad de la enzima monoaminoxidasa A. (52)

E. SEPARACIÓN DE FLAVONOIDES

Se pueden utilizar diferentes técnicas cromatográficas: para la determinación de flavonoides en extractos crudos de plantas o en fracciones son especialmente utilizadas la cromatografía de papel (CP) y la cromatografía de capa fina (CCF). Por otro lado, son indispensables para la separación de flavonoides la CP preparativa, la CCF, la cromatografía de columna (CC) y especialmente la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). (53)

Cromatografía en columna

Quizás la técnica que ha sido más utilizada para la purificación de productos naturales en general, es la cromatografía en columna. Esta técnica básicamente consiste en la aplicación de una mezcla de flavonoides (en solución) a la columna, la cual cuenta con un adsorbente y la subsecuente elución secuencial de los compuestos individuales con solventes apropiados. (53) (54)

Para realizar cromatografía de columna los soportes más utilizados son Sephadex LH-20, ODS y poliamida, aunque la utilización de resinas como DIAION HP-20 y Amberlite XAD-2 o XAD-7, con gradientes de elución de metanol – agua, son un excelente método para la obtención de fracciones ricas en flavonoides. (54) Muchos compuestos pueden separarse mediante el uso de adsorbentes sintéticos, por ejemplo, extractos de plantas como medicamentos a base de hierbas y pigmentos naturales, antibióticos fermentados como penicilinas y cefalosporinas, péptidos como insulina, proteínas, vitaminas, nutracéuticos como polifenoles y más. (55)

F. IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

La reacción más usual para la detección de los flavonoides en un extracto de planta es la reacción de Shinoda. (56)

Espectroscopía de Masas, Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y UV/Vis son las técnicas más utilizadas para dilucidar la estructura de los flavonoides. También se usan otras tres técnicas: la cristalografía de rayos X, con el potencial de resolver estructuras completas, pero se ve obstaculizada por la dificultad de obtener buenos cristales; el dicroísmo circular y las espectroscopías vibracionales se utilizan para resolver detalles estructurales específicos. (57)

Reacción de Shinoda

Al extracto se coloca un pequeño trozo de magnesio y unas pocas gotas de HCl concentrado, el desarrollo inmediato de coloración es indicativo de la presencia de: flavonas (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo), isoflavanonas, chalconas y auronas no dan coloración. (56)

Espectroscopía UV/Vis

La espectroscopía UV/Vis fue una de las primeras técnicas rutinariamente utilizadas para el análisis de flavonoides debido a la existencia de dos bandas características UV/Vis en los flavonoides, la banda I en el rango de 300 a 550 nm, derivada del anillo B y la banda II en el Rango de 240 a 285 nm, que surge del anillo A. Por ejemplo, mientras que la banda I de flavonas y flavonoles se encuentra en el rango de 240 - 285 nm, la de flavanona (sin instauración de anillo C) se encuentra en el rango de 270 - 295 nm; por el contrario, la banda II de flavonas y flavanonas (sin grupo 3-OH) se encuentra alrededor de 303 - 304 nm, y la de flavonoles 3-hidroxilados se centra alrededor de 352 nm. (57)

Los espectros de los flavonoides son determinados usualmente en solución metanólica. El espectro de absorción en el UV-Visible del compuesto aislado es útil también para determinar el tipo de flavonoide, así como su modelo de oxigenación. (58)

La variación de estos rangos depende del modelo de hidroxilación y del grado de sustitución de los hidroxilos: (58)

TABLA N° 5: Valores de absorción para las bandas I y II de los diferentes tipos de flavonoides.

Banda II (nm)	Banda I (nm)	Tipo de Flavonoide
250-280	310-350	Flavonas
250-280	330-360	Flavonoles (3-OH substituído)
250-280	350-385	Flavonoles (3-OH libre)
245-275	310-330	Isoflavonas (5-deoxi-6,7-dioxi)
275-295	300-330	Isoflavonas, dihidroflavonoles
230-270 (baja intensidad)	340-390	Chalconas
230-270 (baja intensidad)	380-430	Auronas
270-280	465-560	Antocianidinas, antocianinas

Fuente: Lock O., 1997.

2.4.4. SALUD MENTAL Y TRASTORNOS MENTALES

La salud mental, o más específicamente de los trastornos mentales, también denominados neuropsiquiátricos y del comportamiento, se han convertido en una de las mayores preocupaciones de la población, la falta de acceso de la población a los servicios de salud mental constituye en un riesgo para su bienestar general y social. (59)

En términos epidemiológicos, la salud mental contribuye con la carga global de las enfermedades en alrededor de 12%, representa hasta 28% de los años vividos con discapacidad y constituye una de las tres principales causas de mortalidad entre las personas de 15 a 35 años, considerando el suicidio. (60) En el caso del Perú, en el año 2014, solo el 32% de personas con trastornos severos de salud mental recibía algún tipo de tratamiento, mientras que solo el 18.1% de las personas con trastorno de salud mental moderado recibió atención. (61)

Hay una gran variedad de trastornos mentales, cada uno de ellos con manifestaciones distintas. En general, se caracterizan por una combinación de alteraciones del pensamiento, la percepción, las

emociones, la conducta y las relaciones con los demás. Entre ellos se incluyen la depresión, el trastorno afectivo bipolar, la esquizofrenia y otras psicosis, la demencia, las discapacidades intelectuales y los trastornos del desarrollo, como el autismo. La prevalencia de los trastornos mentales continúa aumentando, causando efectos considerables en la salud de las personas y graves consecuencias a nivel socioeconómico y en el ámbito de los derechos humanos en todos los países. (62)

La depresión junto con la ansiedad, es uno de los problemas más comunes por el que la gente busca ayuda clínica. No es de extrañar que sea el diagnóstico más frecuente, compartido a menudo con la ansiedad. Así mismo, la depresión y la ansiedad forman parte de otros problemas clínicos. (63)

Los trastornos depresivos son los más prevalentes entre los trastornos psiquiátricos, causando sufrimiento a los pacientes, sobrecarga familiar y alto riesgo de comportamiento suicida. (64)

2.4.5. DEPRESIÓN EN EL SER HUMANO

El paciente con depresión presenta tristeza, pérdida de interés y de la capacidad de disfrutar, sentimientos de culpa o baja autoestima, trastornos del sueño o del apetito, cansancio y falta de concentración. También puede presentar diversos síntomas físicos sin causas orgánicas aparentes. La depresión puede ser de larga duración o recurrente, y afecta considerablemente a la capacidad de llevar a cabo las actividades laborales y académicas y de afrontar la vida cotidiana. En su forma más grave, puede conducir al suicidio. (62)

La depresión no es culpa de la persona que la padece, como tampoco es una debilidad de la personalidad. Es una enfermedad médica que es muy frecuente y puede afectar a cualquier persona. La depresión se concibe como una consecuencia de alteraciones en los neurotransmisores cerebrales, dada la evidencia de que los

antidepresivos modifican neurotransmisores, principalmente serotonina y la noradrenalina. (65)

Según el Instituto Nacional de Salud Mental de Estados Unidos, algunos síntomas de la depresión son:

- ✓ Tristeza, ansiedad o sentimiento de "vacío" persistente
- ✓ Sentimientos de desesperanza o pesimismo
- ✓ Irritabilidad
- ✓ Sentimientos de culpa, inutilidad o impotencia
- ✓ Pérdida de interés o placer en aficiones y actividades
- ✓ Disminución de la energía o fatiga
- ✓ Hablar más despacio
- ✓ Sentirse inquieto o tener problemas para permanecer sentado.
- ✓ Dificultad para concentrarse, recordar o tomar decisiones.
- ✓ Dificultad para dormir, despertar temprano por la mañana o dormir demasiado.
- ✓ Apetito y/o cambios de peso.
- ✓ Pensamientos de muerte o suicidio, o intentos de suicidio.
- ✓ Dolores o molestias, dolores de cabeza, calambres o problemas digestivos sin una causa física clara y/o que no se alivian con el tratamiento.

Estos signos y síntomas deben presentarse la mayor parte del día, casi todos los días, durante al menos dos semanas, lo cual sería un indicativo de estar sufriendo de depresión. (66)

2.4.6. ETIOPATOGENIA DE LA DEPRESIÓN

La depresión es causada por una combinación de factores genéticos, biológicos, ambientales y psicológicos. La depresión puede ocurrir en cualquier edad, pero a menudo comienza en la edad adulta. (66)

Sea hereditario o no, el trastorno depresivo severo está a menudo asociado con cambios en las estructuras o funciones cerebrales: Disminución del metabolismo del área prefrontal izquierda del cerebro. Situación que se normaliza luego de los diferentes

tratamientos (65). Además investigaciones genéticas indican que es posible de que el riesgo de padecer de depresión implique la combinación de múltiples genes con factores ambientales o con otros factores. (67)

A veces los medicamentos tomados para ciertas enfermedades físicas pueden causar efectos secundarios que contribuyen a la depresión (66). En los últimos años, la investigación científica ha demostrado que algunas enfermedades físicas pueden acarrear problemas mentales. Enfermedades tales como los accidentes cerebro-vasculares, los ataques del corazón, el cáncer, la enfermedad de Parkinson y los trastornos hormonales, pueden llevar a una enfermedad depresiva. (65)

Otro de los desencadenantes ambientales identificados son las situaciones de tensión psíquica en etapas tempranas del desarrollo, lo cual parece inducir cambios funcionales de estos sistemas. (68)

En su génesis participan factores biológicos, que incluyen disfunción de los circuitos de noradrenalina, serotonina y dopamina del SNC, junto con cambios profundos en el funcionamiento del tallo cerebral, el hipotálamo y las estructuras del sistema límbico. (68) Se sabe que niveles bajos de serotonina y noradrenalina producen sedación e incluso depresión, sin embargo respecto al papel de cada sustancia hay discrepancias. Por todo esto se podría hipotetizar que en la depresión lo que habría sería, o bien, un exceso en la actividad de la MAO, o bien, un déficit en la producción de la serotonina. (69)

La hipótesis de las monoaminas propone que el trastorno depresivo mayor se debe a deficiencia en los neurotransmisores serotonina (5-HT), norepinefrina y en menor grado dopamina (DA). La monoaminoxidasa A (MAO-A) es una enzima que regula las concentraciones de las tres monoaminas 5-HT, norepinefrina y dopamina en el cerebro. El sistema serotoninérgico juega un papel crítico en la regulación del humor y el temperamento, por ello los medicamentos para aumentar la neurotransmisión serotoninérgica

son eficaces para tratar una variedad de trastornos mentales, incluido el trastorno depresivo mayor. El transportador de serotonina (5-HTT) juega un rol importante en la neurotransmisión serotoninérgica por la facilitación de la recaptura de serotonina de la hendidura sináptica. El sistema dopaminérgico juega un papel importante en la regulación de las funciones motoras, cognitivas y emocionales. Se ha sugerido una disminución en la liberación o producción de la norepinefrina en individuos deprimidos, lo que señala una desregulación del sistema noradrenérgico que juega un papel importante en la fisiopatología de los trastornos afectivos. Las funciones de la norepinefrina son mediadas por las proteínas de unión de norepinefrina, como los receptores adrenérgicos y los transportadores de norepinefrina. El transportador de norepinefrina (TNE) es un objetivo mayor para los antipsicóticos, psicoestimulantes y antidepresivos, porque estos agentes bloquean la vía de transporte, resultando en una potenciación de la actividad sináptica de la norepinefrina. (70)

La hipótesis glutamatérgica y GABAérgica de la depresión, implica a los neurotransmisores glutamato (excitatorio) y GABA (inhibitorio) del sistema nervioso central y la expresión de los genes que participan en su regulación en la depresión. (70)

2.4.7. EPIDEMIOLOGÍA DE LA DEPRESIÓN

La depresión es un trastorno mental frecuente y una de las principales causas de discapacidad en todo el mundo. Afecta a más de 300 millones de personas en todo el mundo, con mayor prevalencia en las mujeres que en los hombres. (62)

Los trastornos depresivos son comunes. La depresión es dos veces más común en las mujeres que en los hombres. Los motivos no están claros, pero sin duda influyen aspectos hormonales, aspectos que tienen que ver con el ciclo reproductivo y también con aspectos psicosociales (71). Aunque algunas mujeres pueden entrar en la menopausia sin problemas de estado de ánimo, otras tienen mayor

riesgo de padecer depresión. Esto parece ocurrir incluso entre las mujeres que no tienen antecedentes de depresión. (72) (73)

En un estudio epidemiológico de salud mental realizado en Lima metropolitana y Callao en el año 2012 se estima que el 17,2 % de la población presenta episodios depresivos, además de la alta prevalencia de depresión en adolescentes y en adultos (74).

Un episodio de depresión dura habitualmente de 6 a 9 meses, pero en el 15 al 20% de los pacientes dura 2 años o más. Los episodios generalmente tienden a recurrir varias veces a lo largo de la vida. (75)

2.4.8. TRATAMIENTOS ACTUALES DE LA DEPRESIÓN

Las opciones de tratamiento incluyen la psicoterapia, los psicofármacos, la terapia electroconvulsiva, y la terapia magnética transcraneal y profunda. El tratamiento farmacológico disponible en la actualidad únicamente alcanza tasas de respuesta y remisión sintomática modestas. Los antidepresivos actuales, a pesar de sus distintos mecanismos de acción, tienen como común denominador la regulación de sistemas de neurotransmisión monoaminérgica (serotonina, noradrenalina, dopamina), y comparten similar eficacia. La elección del antidepresivo a utilizar debe individualizarse y basarse en las características sintomáticas del cuadro depresivo, comorbilidades, efectos secundarios, interacciones farmacológicas y disponibilidad. (76)

Se ha demostrado que los programas preventivos reducen su incidencia tanto en los niños (por ejemplo, mediante la protección y el apoyo psicológico en casos de maltrato físico o abuso sexual) y en los adultos (por ejemplo, mediante la asistencia psicosocial). La depresión de leve a moderada se puede tratar eficazmente con terapias que utilizan el diálogo, como la terapia cognitivo-conductual o la psicoterapia. Los antidepresivos pueden ser un tratamiento eficaz para la depresión de moderada a grave, pero no son el tratamiento de elección para la depresión leve. Tampoco se deben emplear para

tratar la depresión infantil y no son el tratamiento de elección en los adolescentes, a quienes se deben prescribir con cautela. (62)

Existe evidencia de que el tratamiento combinado (que incluye el tratamiento psicológico junto al tratamiento farmacológico) es más efectivo que el tratamiento psicológico por sí solo únicamente a corto plazo, pero no a largo plazo. (77)

En el contexto de la atención primaria, donde el manejo y el dominio de las técnicas psicoterapéuticas son menos conocidas y presentan mayores dificultades por las necesidades del tiempo, la intervención más eficaz para lograr la remisión de un cuadro depresivo es, indudablemente, el tratamiento farmacológico. (20)

2.4.9. CLASIFICACIÓN DE FÁRMACOS ANTIDEPRESIVOS

La depresión parece estar asociada a la existencia de niveles bajos de determinados neurotransmisores a nivel cerebral, como serotonina, noradrenalina o dopamina. Por ello, los fármacos antidepresivos intentan aumentar alguna de estas sustancias en el cerebro a través de distintos mecanismos de acción. (78)

El tratamiento de la depresión se basa en un grupo variado de agentes terapéuticos antidepresivos, en parte porque la depresión clínica es un síndrome complejo de gravedad también muy variable. Los primeros fármacos que se utilizaron con buenos resultados fueron los antidepresivos tricíclicos, que ejercen una gran variedad de efectos neurofarmacológicos, además de su acción primaria supuesta, que es inhibir la captación de noradrenalina (y serotonina) en las terminaciones nerviosas, lo que da por resultado facilitación sostenida de la función noradrenérgica, y quizá serotoninérgica, en el encéfalo. Se han empleado también inhibidores de la MAO, que incrementan las concentraciones cerebrales de muchas aminas. Y recientemente aparecieron una serie de medicamentos innovadores que han resultado muy eficaces, entre ellos varios inhibidores del transportador de neurotransmisores que bloquean de manera

selectiva la recaptación de serotonina, ISRS, los cuales desplazaron a los inhibidores de la monoaminoxidasa. (79)

La mayor parte de los antidepresivos actúan sobre la recaptación de monoaminas. La acción inhibitoria sobre la recaptación de noradrenalina o 5-HT conduce a un incremento de estas aminas en el espacio sináptico, gracias al cual se produce el efecto antidepresivo. El aumento inicial de las monoaminas en la sinapsis lleva inicialmente a una hiperactivación de los autorreceptores presinápticos α_2 - adrenérgicos o 5-HT_{1A}, mediante la que se potencia la retroacción negativa sobre la síntesis y liberación de noradrenalina y 5-HT, respectivamente. Posteriormente, el tratamiento durante una o dos semanas con estos antidepresivos puede acabar produciendo una desensibilización o disminución de los mencionados autorreceptores, lo que debe conducir a que el funcionamiento noradrenérgico o serotoninérgico se normalice e incluso se incremente. (78)

A. ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS (ATC)

Inhibe la recaptación neuronal de noradrenalina y serotonina, aumentando así su concentración dentro de las sinapsis y aumentando la neurotransmisión. Su eficacia para los dos tipos de receptores de neurotransmisores varía y esto resulta en diferentes frecuencias e intensidades de efectos secundarios. (80)

Los tricíclicos fueron los primeros en aparecer. Presentan una elevada eficacia aunque, debido a los efectos secundarios que producen (sedación, sequedad de boca, estreñimiento, temblores, hipotensión, etc.), se recomienda iniciar el tratamiento con dosis bajas e ir aumentándolas en función de la tolerancia del paciente y del efecto antidepresivo, hasta conseguir la dosis que equilibre la mayor eficacia posible con los menores efectos secundarios. Se tienden a utilizar en casos graves de depresión. Por su perfil sedante, alguno de ellos se indica también en las depresiones con elevado nivel de ansiedad. (78)

B. INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA RECAPTACIÓN DE SEROTONINA (ISRS)

Los Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina (ISRS) es un grupo farmacológico que ha desplazado a los antidepresivos tricíclicos (ATC) como tratamiento del trastorno depresivo mayor y el trastorno de angustia. (81) Inhibe la recaptación neuronal de serotonina al unirse específicamente a los receptores 5-HT dentro de las sinapsis. Sus efectos sobre la noradrenalina son mínimos. (80)

Los ISRS no están recomendados para el tratamiento de rutina de la depresión menor persistente (menos de dos años de duración) o depresión mayor leve, porque la relación riesgo - beneficio es pobre, considerándose que su efecto en la depresión menor es similar al placebo según diferentes guías de consenso. (82)

Fluoxetina

Es un bloqueador altamente específico de la recaptación de serotonina (sustancia química cerebral esencial) con un mínimo efecto sobre otros receptores y fue el primero de una clase completamente nueva de medicamentos denominados inhibidores de la recaptación de serotonina (ISRS). (79) (83) (84)

La fluoxetina se absorbe bien después de su administración oral. La concentración máxima en plasma se alcanza entre 6 y 8 horas. La fluoxetina se une extensamente a las proteínas plasmáticas y se distribuye ampliamente. Se alcanzan concentraciones estables en plasma después de su administración por varias semanas. Las concentraciones estables en plasma después de su administración por tiempo prolongado son similares a las concentraciones observadas a las 4 o 5 semanas. La fluoxetina es metabolizada extensamente en el hígado a norfluoxetina y a una variedad de otros metabolitos no identificados que son excretados en la orina.

La vida media de eliminación de fluoxetina es de 4 a 6 días y la de su metabolito activo es de 4 a 16 días. (85)

Dada la menor incidencia de efectos anticolinérgicos antihistamínicos y alfa bloqueantes, así como la mayor facilidad para su dosificación, hacen que sean los fármacos antidepresivos en atención primaria. Representan en la actualidad la opción terapéutica de primera línea en el campo de la depresión de la forma evidente en los casos de depresión leve y moderada y de forma más controvertida en las depresiones severas, además es la mejor tolerada y se puede iniciar en dosis que formalmente es efectiva. (79) (83) (84)

TABLA N° 6: Efectos adversos asociados con fluoxetina y otros ISRS.

Cardiacos	Palpitaciones
Sistema Endócrino	Secreción inadecuada de hormona antidiurética
Ojos	Visión borrosa, midriasis
Gastrointestinales	Diarrea, boca seca, dispepsia, disfagia, sangrado gastrointestinal, náusea, vómito, dolor esofágico
Metabolismo y Nutrición	Disminución del apetito (incluye anorexia).
Musculo esqueléticos y del tejido conectivo	Contracturas musculares.
Sistema Nervioso	Ataxia, trastornos del equilibrio, síndrome bucogloso, convulsiones, trastornos de la atención, mareos, disgeusia, discinesia, cefalea, letargia, alteraciones de la memoria, mioclonus, hiperactividad psicomotora, síndrome serotoninérgico, somnolencia, temblores
Psiquiátricos	Sueños anormales, ansiedad, bruxismo, despersonalización, humor elevado, humor disfórico, hipomanía, insomnio, disminución de la libido, manía, nerviosismo, orgasmo anormal, intranquilidad, alteraciones del sueño, tensión, pensamiento anormal.
Renales y urinarios	Disuria, alteraciones de la micción, micción frecuente

Sistema reproductor y mamas	Alteraciones de la eyaculación, disfunción eréctil, galactorrea, sangrado ginecológico, priapismo, hiperprolactinemia, disfunción sexual
Respiratorios, torácicos y mediastinales	Bostezos
Piel y tejido subcutáneo	Alopecia, angioedema, sudor frío, equimosis, hiperhidrosis, eritema multiforme, incremento en la tendencia a equimosis, fotosensibilidad, prurito, erupción cutánea
Vasculares	Rubicundez, hipotensión, vasculitis, vasodilatación.

Fuente: Eli Lilly y Compañía de México, S.A., 2016.

C. INHIBIDORES DE LA RECAPTACIÓN DE NORADRENALINA

Inhibe la recaptación de los neurotransmisores norepinefrina (noradrenalina) y epinefrina (adrenalina) mediante el bloqueo de la acción del transportador de norepinefrina, lo que conduce a un aumento de las concentraciones extracelulares de los dos neurotransmisores. (80)

D. INHIBIDORES DE LA RECAPTACIÓN DE SEROTONINA Y NORADRENALINA

Inhibe la recaptación neuronal de serotonina y noradrenalina en los extremos neuronales, aumentando así ambos niveles dentro de la sinapsis. (80) Su mecanismo de acción es más selectivo, y por ello son fármacos con un perfil de efectos secundarios mejor tolerados que los fármacos heterocíclicos. Por tanto, se puede iniciar el tratamiento con dosis usualmente efectivas. Al poder indicarse desde el primer día a dosis terapéuticas, es posible que necesiten menor tiempo de inicio de la acción antidepresiva. (78)

E. INHIBIDORES DE LA RECAPTACIÓN DE NORADRENALINA Y DOPAMINA

Inhibe la recaptación de los neurotransmisores norepinefrina y dopamina bloqueando la acción del transportador de norepinefrina y el transportador de dopamina, respectivamente. (80)

F. INHIBIDORES DE LA MONOAMINOOXIDASA (IMAO)

Inhibe la enzima MAO, se produce acumulación de los neurotransmisores norepinefrina, serotonina y dopamina en el cerebro. (80) Los IMAO parecen ser algo menos eficaces que los ATC en la depresión grave, aunque presentan mayor eficacia en las depresiones atípicas. Por ello y por la mayor posibilidad de interacciones con diversos fármacos y alimentos, no se consideran fármacos de primera elección. (78)

TABLA N° 7: Fármacos empleados en el tratamiento de la depresión.

Clase		Ejemplos	Dosis diaria en adultos para la depresión (mg)
Inhibidores de la captación de monoaminas	Antidepresivos tricíclicos	Amitriptilina Clomipramina Desipramina Dosulepina Doxepina Imipramina Lofepramina Nortriptilina Protriptilina Trimipramina	75-200 10-250 25-300 75-225 75-300 75-200 140-210 75-150 10-60 50-300
	Antidepresivos tetracíclicos	Amoxapina Maprotilina Mianserina	100-600 25-225 30-90
	Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina	Citalopram Escitalopram Fluoxetina Fluvoxamina Paroxetina Sertralina	20-40 10-20 20-60 50-300 20-50 25-200
	Inhibidores de la Recaptación de Noradrenalina	Atomoxetina Reboxetina	/ 8-12
	Inhibidor de la Recaptación de Serotonina y Noradrenalina	Duloxetina Venlafaxina	30-120 75-375
	Inhibidor de la Recaptación de Noradrenalina y Dopamina	Bupropion	/
	Inhibidores de la Monoamina Oxidasa	IMAO irreversibles no selectivos	Fenelzina Tranilcipromina Isocarboxazida
IMAO reversibles selectivos (tipo A)		Moclobemida	150-600
IMAO selectivos (tipo B)		Rasagilina Selegilina	/ /

Fuente: Adaptado de Agius M. & Bonnici H., 2017.

G. ANTIDEPRESIVOS ATÍPICOS Y OTRAS CLASES

TABLA N° 8: Antidepresivos atípicos y otras clases.

Fármaco	Clasificación de drogas	Mecanismo de acción	Rango de dosis (mg)
Mirtazapina	Antidepresivo noradrenérgico y serotoninérgico específico	Antagoniza los subtipos de receptores adrenérgicos α_2 - y receptores de serotonina 5-HT _{2A} , 5-HT _{2C} y 5-HT ₃ para incrementar la neurotransmisión noradrenérgica central y serotoninérgica.	15-45
Trazodona Nefazodona	Antagonista e inhibidor de la recaptación de serotonina	Antagoniza todos los sitios receptores de 5-HT, excepto el 5-HT _{1A} , donde actúa como un agonista parcial. También simultáneamente (débilmente) inhibe los transportadores de serotonina	150-600
Tianeptina	Potenciador selectivo de la recaptación de la serotonina	Aumenta la absorción de serotonina en las sinapsis. No se sabe cómo esto resulta en el alivio de la depresión, pero las teorías incluyen la modulación de la transmisión glutamatérgica y sus efectos agonistas sobre los receptores μ -opiáceos.	12-36
Triptófano	Aminoácido esencial	Convertido en serotonina en sí mismo después de reacciones de condensación, descarboxilación reductiva y catálisis	6000-12000
Agomelatina	Antidepresivo melatoninérgico	Agonista melatoninérgico de los receptores MT ₁ y MT ₂ y antagonista del receptor 5HT _{2C} de serotonina.	25-50

Fuente: Adaptado de Agius M. & Bonnici H., 2017.

2.4.10. MODELOS EXPERIMENTALES DE DEPRESIÓN

Los modelos experimentales en animales son herramientas importantes para investigar la etiología de la depresión, aunque los modelos en animales ayudan la comprensión de los trastornos

psiquiátricos, tienen algunas limitaciones, como por ejemplo, los animales no pueden presentar sentimientos de tristeza, culpa o pensamientos suicidas, síntomas principalmente limitados a los humanos. (86) Se han establecido algunos criterios para la validación de un modelo animal:

TABLA N° 9: Criterios para la validez de un modelo animal de depresión.

Criterios	Manifestaciones
Validez aparente (Face validity)	Las manifestaciones de comportamiento deben ser similares a los síntomas observados en pacientes con depresión.
Validez de constructo (Construct validity)	Los cambios fisiopatológicos que ocurren en pacientes con depresión, como los cambios en el eje hipotálamo – hipófisis – suprarrenal, la atrofia del hipocampo y los neurotransmisores también deben ocurrir en los animales.
Validez predictiva (Predictive validity)	Los cambios de comportamiento deben revertirse con un tratamiento eficaz (antidepresivos y/o terapia electroconvulsiva).

Fuente: Abelaira H.M. et al., 2013.

En la actualidad, existen varios modelos experimentales en la evaluación de la actividad antidepresiva en roedores, todos estos modelos están basados en dos principios:

1. Pruebas animales basadas en la interacción entre antidepresores potenciales y sustancias de referencia

❖ Potenciación de la anfetamina (Amphetamine potentiation):

Como resultado el nivel de la anfetamina aumenta la concentración en el cerebro, lo que sugiere la utilidad de la prueba de potenciación de anfetamina como prueba de detección. Esta prueba no es específica, a veces da resultados falsos negativos o falsos positivos. (32)

❖ Inversión de la acción de la reserpina (Reversal of reserpine action):

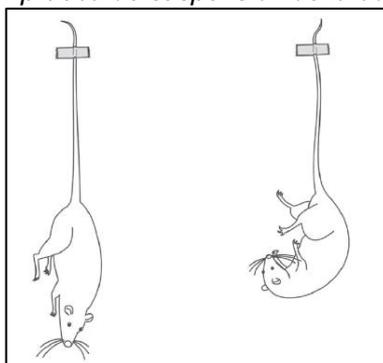
La administración de reserpina induce ptosis, catalepsia e hipotermia en roedores lo que se puede revertir con compuestos que tienen una actividad similar a la de los antidepresivos, sin embargo, muchos medicamentos antidepresivos nuevos no alteran la acción de la reserpina. Además, también se observan muchos resultados falsos positivos en esta prueba. (32)

2. Pruebas animales basadas en la respuesta al estrés

Modelos de estrés agudo - Modelos predictivos de actividad antidepresiva

- ❖ **Prueba de natación forzada (Forced Swimming Test):** Tiene varias ventajas como la relativa simplicidad, los bajos costos y el hecho de que es una herramienta rápida y confiable para investigar la posible actividad antidepresiva (tiene una fuerte validez predictiva). Desafortunadamente, la prueba tiene una pobre validez aparente y constructo. (32)
- ❖ **Prueba de suspensión de la cola (Tail Suspension Test):** En este procedimiento, los animales son suspendidos por sus colas. Al principio, los roedores se involucran de inmediato en conductas de escape, pero luego toman una postura inmóvil, la cual es medida como tiempo de inmovilidad. Una de las ventajas de esta prueba es que puede detectar un amplio espectro de antidepresivos, también es barato y poco sofisticado. (32)

FIGURA N° 8: Representación esquemática de movilidad e inmovilidad en la prueba de suspensión de la cola.



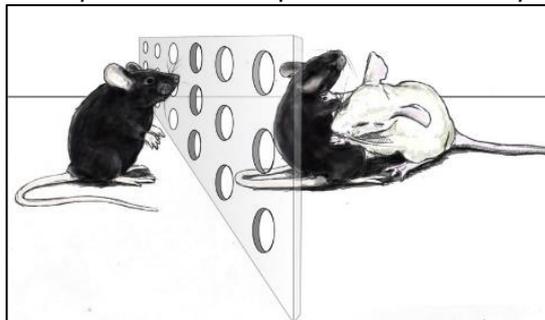
Fuente: Kedzierska E. & Wach I., 2016.

Modelos de estrés crónico - Manipulaciones ambientales

- ❖ **Indefensión aprendida (Learned helplessness):** El estado de tipo depresivo en roedores es inducido por varias sesiones de choques eléctricos. Las principales ventajas de la indefensión aprendida como modelo de depresión son su muy fuerte validez aparente y su validez predictiva. (32)

- ❖ **Estrés leve crónico (Chronic mild stress):** Se compone de una exposición de factores estresantes leves a los roedores. Entre ellos se encuentran: reducciones de temperatura mínimas, cambios de compañeros de jaula, períodos de privaciones de alimentos y agua, interrupciones abruptas circadianas y otras manipulaciones inofensivas pero impredecibles. Tiene ciertas desventajas, es más caro que los otros modelos y es difícil de llevar a cabo (demanda de espacio, necesita una duración prolongada y mano de obra intensiva). (32)
- ❖ **Estrés por derrota social (Social defeat stress):** En este modelo, el conflicto social se crea entre machos experimentales (intrusos) que se colocan dentro del territorio de los machos agresivos (residentes). Los intrusos son investigados, atacados y derrotados por ellos. Los animales experimentales en el paradigma de estrés de derrota social muestran una interacción social reducida (evitación social), anhedonia (disminución de la preferencia de sacarosa y actividad sexual), actividades exploratorias y locomotoras disminuidas. La principal desventaja de este modelo es el hecho de que es muy absorbente en el tiempo (requiere 20 días). Otro inconveniente es que solo los roedores machos se pueden utilizar para este modelo. (32)

FIGURA N° 9: Representación esquemática de estrés por derrota social.



Fuente: Siale O.K. et al., 2016.

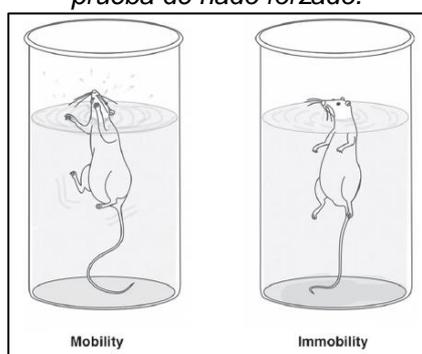
Sobre la base de los criterios de validez, se han desarrollado y se están desarrollando muchos modelos animales de depresión, incluidos los basados en ingeniería genética, daño cerebral y manipulaciones ambientales. (87)

A. PRUEBA DE NADO FORZADO MODIFICADO

La prueba de nado forzado (Forced Swimming Test, FST) fue desarrollado por Porsolt y colaboradores en 1977 y modificado por Detke (1995) es uno de los más ampliamente utilizados, por su valor predictivo, ya que posee una alta capacidad para detectar actividad antidepresiva en una gran número de sustancias, extractos y fracciones de plantas medicinales (88) (41). Además este modelo es probablemente el más empleado en la búsqueda del potencial antidepresivo de un compuesto nuevo. (89)

El parámetro más importante de esta prueba, es el tiempo de inmovilidad de los animales cuando se los somete a la prueba (figura N° 10). Un aumento en el tiempo de latencia y una disminución en el tiempo de inmovilidad de los animales son indicativos de actividad antidepresiva (90).

FIGURA N° 10: Representación esquemática de movilidad e inmovilidad en la prueba de nado forzado.



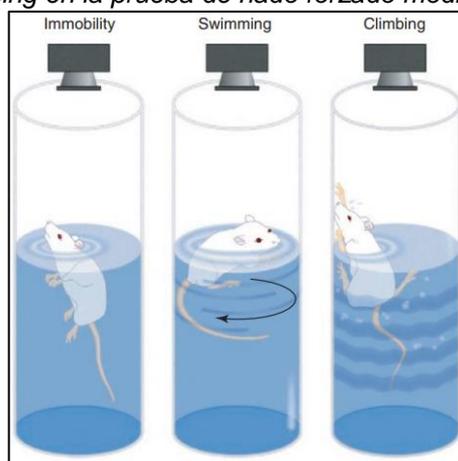
Fuente: Abelaira H. M. et al., 2013.

Los fármacos antidepresivos tienen la capacidad de disminuir la duración del periodo de inmovilidad. Por lo cual la prueba de nado forzado es una prueba farmacológica experimentalmente válida en la búsqueda de sustancias de origen vegetal que pudieran tener eficacia antidepresiva en la clínica. Este modelo es sensible a fármacos como los tricíclicos, IMAO, ISRS, cada uno de los cuales muestra respuestas variables. (91)

Varias clases de antidepresivos reducen el tiempo de inmovilidad durante la FST. Los medicamentos que afectan a la

neurotransmisión noradrenérgica aumentan el comportamiento de “climbing”, mientras que los medicamentos que afectan a la neurotransmisión serotoninérgica aumentan el tiempo de “swimming”. (87)

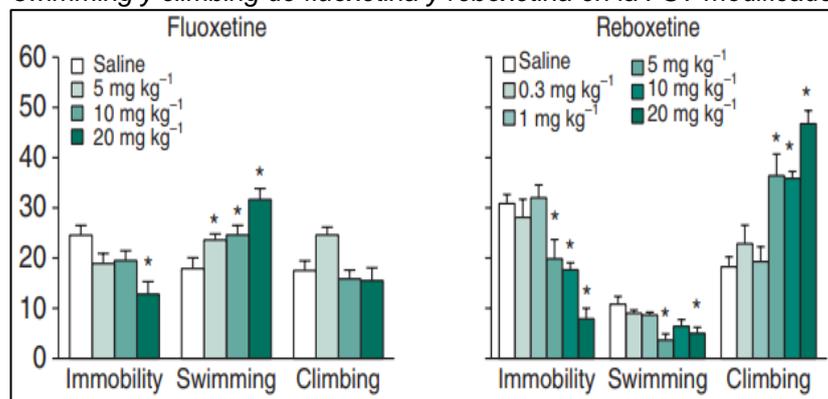
FIGURA N° 11: Representación esquemática de inmovilidad, swimming y climbing en la prueba de nado forzado modificado.



Fuente: Cryan J.F. et al., 2002.

Por lo tanto, los antidepresivos que principalmente potencian la neurotransmisión mediada por 5-HT aumentan el comportamiento de swimming, mientras que aquellos con acciones primarias a través de catecolaminas aumentan el comportamiento de climbing. En la figura N° 12, se muestran los efectos diferenciales del inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (fluoxetina) y del inhibidor de la recaptación de noradrenalina (reboxetina) sobre la FST. (92)

FIGURA N° 12: Representación esquemática del tiempo de inmovilidad, swimming y climbing de fluoxetina y reboxetina en la FST modificado.



Fuente: Cryan J.F. et al., 2002.

B. FACTORES QUE AFECTAN LA PRUEBA DE NADO FORZADO

Durante la prueba de nado forzado los animales podrían liberar una “sustancia de alarma” que modifique la conducta del mismo animal en estudio, pero también la de los otros animales sometidos subsecuentemente a la prueba cuando no se ha cambiado el agua del estanque entre prueba y prueba. En ciertos casos, la inmovilidad disminuye en los animales introducidos al estanque donde previamente nado otra rata, lo que no sucede en los animales forzados a nadar en agua limpia. (93) (94)

La profundidad del agua debe considerarse como que los ratones no deberían sentir un límite por debajo del nivel de agua. Sus colas no deben tocar la parte inferior del cilindro o se alteraría el comportamiento de los ratones. El aumento de la profundidad del agua disminuye el tiempo de inmovilidad. (95)

Actualmente, la mayoría de los estudios utilizan agua más caliente entre 23 ° C y 28 ° C. (95) La variación de la temperatura del agua en el estanque es otro factor modificador de la inmovilidad de los animales forzados a nadar. En este sentido, la actividad de las ratas o los ratones durante la prueba de nado se da en forma de “U”, es decir, a temperaturas por debajo de los 20°C y por arriba de los 29°C, el tiempo empleado en el nado es mayor que en los animales que nadan en agua a temperatura intermedias. (93) (94)

Otro factor es el intervalo de observación. Ha sido modificado por algunos investigadores para aumentar la sensibilidad o la especificidad de la FST. Algunos autores han creado un procedimiento de análisis totalmente nuevo para calificar la inmovilidad. Para Lucki, 1997, el intervalo de observación se puede separar cada 5 segundos, en las que se puntúa el comportamiento principal. (95)

2.5. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

1. **ANSIEDAD:** Miedo anticipado a padecer un daño o desgracia futuros, acompañada de un sentimiento de temor o de síntomas somáticos de tensión. (96)
2. **ANTIDEPRESIVO:** Relativo a una sustancia o a una medida que impide o alivia la depresión. (97)
3. **ANTINOCICEPTIVO:** Describe o se relaciona con cualquier factor único que aumenta la tolerancia o reduce la sensibilidad a un estímulo peligroso o dañino, por ejemplo, un estímulo que puede causar dolor. (98)
4. **DEPRESIÓN:** Estado emocional anormal caracterizado por un excesivo sentimiento de tristeza, melancolía, desanimo, demerito, vacío y desesperanza, en grado inapropiado y desproporcionado respecto a la realidad. (99)
5. **ETNOMEDICINA:** El estudio comparativo de cómo las diferentes culturas ven la enfermedad y cómo la tratan o la previenen. (100)
6. **GABA:** Ácido Gamma-Aminobutírico: Sustancia biológicamente activa que se encuentra en las plantas y en el cerebro y otros tejidos animales; es un neurotransmisor que inhibe la activación de las neuronas. (101)
7. **NEUROTRANSMISOR:** Cualquiera de los numerosos agentes químicos que modifican o producen impulsos nerviosos entre las sinapsis. (99)
8. **NORADRENALINA:** Norepinefrina ($C_8H_{11}NO_3$), catecolamina que es el medio químico de transmisión a través de las sinapsis en las neuronas postganglionares del sistema nervioso simpático y en algunas partes del SNC, es una hormona vasopresora de la médula suprarrenal y es un precursor de la epinefrina en su vía biosintética principal. (100)
9. **PREVALENCIA:** Número de casos nuevos en una enfermedad o de veces que ha aparecido un caso durante un periodo de tiempo determinado. Se expresa como una razón en la cual el número de casos es el numerador y la población con riesgo es el denominador. (97)
10. **SEROTONINA:** Un neurotransmisor ($C_{10}H_{12}N_2O$) que es un potente vasoconstrictor y se encuentra especialmente en el cerebro, el suero

sanguíneo y la mucosa gástrica de los mamíferos, también llamado 5-HT, 5-hidroxitriptamina. (100)

11. **SIGNO:** Hallazgo objetivo percibido por un explorador, con fiebre, una erupción, disminución de los sonidos respiratorios cuando existe derrame pleural, etc. Muchos signos se acompañan de síntomas. (97)
12. **SINAPSIS:** Región que rodea el punto de contacto entre dos neuronas o entre una neurona y un órgano efector, a través de la cual son transmitidos los impulsos nerviosos por la acción de un neurotransmisor, como la acetilcolina o la noradrenalina. (99)
13. **SÍNDROME:** Complejo de signos y síntomas resultantes de una causa común o que aparecen en combinación como expresión del cuadro clínico de una enfermedad o de una alteración hereditaria. (97)
14. **SÍNTOMA:** Índice subjetivo de una enfermedad o un cambio de estado tal como lo percibe el paciente. (97)
15. **SISTEMA LÍMBICO:** Conjunto de estructuras del rinencéfalo cerebral, asociadas con diversos sentimientos y emociones, como el hambre, el miedo, la excitación sexual, el placer y la tristeza. (99)
16. **TRASTORNO DEPRESIVO MAYOR:** Trastorno del estado de ánimo, caracterizado por la presentación de uno o más episodios depresivos mayores y la ausencia de episodios maníacos, mixtos o hipomaniacos. (99)
17. **TRASTORNO MENTAL:** Estado patológico que se caracteriza por confusión de ideas, perturbación emocional y conducta inadaptada. Puede tener origen orgánico o funcional. (96)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y

MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. MUESTRA VEGETAL

Se emplearon las partes aéreas de *Viola tricolor* L. “pensamiento”, siendo la zona de recolección de la muestra vegetal la comunidad de Janac Chuquibamba (altura: 2941 m.s.n.m.; coordenadas geográficas: S 13° 21' 44.30”; O 71° 54' 32.702”), distrito de Lamay, provincia de Calca, Cusco; los cuales contaron con el certificado de determinación taxonómica correspondiente (**ANEXO N° 1**).

3.1.2. SUJETOS DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron 100 ratones albinos (sexo macho) de especie *Mus músculus*, cepa balb/c/CNPB, provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Salud – Centro Nacional de Productos Biológicos – Coordinación de Bioterio (Lima – Perú), los cuales contaron con el certificado sanitario correspondiente (**ANEXO N° 2**).

3.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN

3.2.1. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE MUESTRA VEGETAL

A. CRITERIOS DE INCLUSIÓN: Partes aéreas (flores de color violeta y tallo) de *V. tricolor* L. en buen estado de conservación.

B. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN: Flores de otros colores de *V. tricolor* L., excepto el violeta o que presenten signos de deterioro.

3.2.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS SUJETOS DE EXPERIMENTACIÓN

A. CRITERIOS DE INCLUSIÓN: 100 ratones albinos (sexo macho) de especie *Mus músculus*, cepa balb/c/CNPB, con un peso promedio de 20-25 gramos.

B. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN: Animales de experimentación que no cumplan con los criterios de inclusión o que se enfermen durante el periodo de adaptación a las condiciones climáticas o de experimentación.

3.3. MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

Materiales de campo:

- Bolsas de papel kraft
- Bolsas de polietileno transparente
- Cámara fotográfica
- Cuchillo
- Guantes de cuero
- Tijeras de podar

Materiales de laboratorio:

- Baguetas
- Columna de cromatografía
- Cubetas de vidrio
- Embudos
- Goteros
- Gradillas
- Matraz de 250mL
- Papel filtro
- Pipetas de 1, 2 y 5mL
- Placas Petri
- Probetas de 100mL
- Soporte universal
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitados de 30, 50, 200 y 250mL

Equipos e Instrumentos del laboratorio:

- Balanza analítica sensible al 0.001g
- Baño maría
- Baño ultrasónico
- Cámara digital
- Cocinilla eléctrica
- Congeladora
- Cronómetro
- Destilador de agua
- Espectrofotómetro UV-Visible
- Estufa
- Hervidora
- Molino de granos
- Rotavapor
- Termómetros

Reactivos:

- Acetato de etilo
- Acetona
- Ácido clorhídrico
- Ácido sulfúrico
- Agua destilada
- Cloroformo
- Cloruro férrico
- Etanol al 40, 70 y 90%
- Hexano
- Limaduras de magnesio

- Metanol
- Reactivo de bajlet
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Fheling
- Reactivo de Liebermann – Burchard
- Resina Diaion® HP-20
- Solución fisiológica al 0,9%
- Solución gelatina

Material farmacológico:

- Fluoxetina (Prozac®) 20mg Cápsulas

Otros materiales:

- Cánulas orales
- Gorras y guantes quirúrgicos descartables
- Jaulas para criar a los animales de experimentación
- Jeringas descartables
- Papel aluminio
- Papel toalla
- Toallas

3.4. DISEÑO METODOLÓGICO

3.4.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Para la determinación de la actividad antidepresiva se realizó un estudio de tipo cuasi-experimental porque se manipula deliberadamente al menos una variable independiente para ver su efecto y relación con una o más variables dependientes; se han utilizado grupos intactos en el cual los sujetos no se asignan de forma aleatoria, si no que dichos grupos ya están formados antes del experimento.

3.4.2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

A. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA PARA EL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Viola tricolor* L. “pensamiento”

Diseño con postprueba únicamente, dosis repetidas y grupo control:

Simbología:

G = Grupo

X = Tratamiento

O = Medición

G ₁	X ₁	X ₂	X ₃	O ₁
G ₂	X ₄	X ₅	X ₆	O ₂
G ₃	X ₇	X ₈	X ₉	O ₃
G ₄	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	O ₄
G ₅	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	O ₅

G₁ = Grupo experimental formado por 5 ratones que recibió 250mg/kg de extracto etanólico de *Viola tricolor* L.

G₂ = Grupo experimental formado por 5 ratones que recibió 500mg/kg de extracto etanólico de *Viola tricolor* L.

G₃ = Grupo experimental formado por 5 ratones que recibió 750mg/kg de extracto etanólico de *Viola tricolor* L.

G₄ = Grupo experimental formado por 5 ratones que recibió fluoxetina a 20mg/kg.

G₅ = Grupo experimental formado por 5 ratones que recibió solución salina al 0.9% a 0.2ml/20g.

X_{1,2,3} = Dosis del extracto etanólico de *Viola tricolor* L. de 250mg/kg administrado cada 12 h.

X_{4,5,6} = Dosis del extracto etanólico de *Viola tricolor* L. de 500mg/kg administrado cada 12 h.

X_{7,8,9} = Dosis del extracto etanólico de *Viola tricolor* L. de 750mg/kg administrado cada 12 h.

X_{10,11,12} = Dosis de fluoxetina a 20mg/kg administrado cada 12 h.

X_{13,14,15} = Administración de solución salina al 0.9% a 0.2ml/20g administrado cada 12 h.

O_{1...O₅} = Mediciones del tiempo de inmovilidad, swimming y climbing en la prueba de nado forzado modificado después de 1 hora de administrado el último tratamiento, por un periodo de 5 minutos.

B. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA PARA EL EXTRACTO FLAVONOÍDICO DE *Viola tricolor* L. “pensamiento”

Diseño con postprueba únicamente, dosis repetidas y grupo control:

Simbología:

G = Grupo

X = Tratamiento

O = Medición

G ₁	X ₁	X ₂	X ₃	O ₁
G ₂	X ₄	X ₅	X ₆	O ₂
G ₃	X ₇	X ₈	X ₉	O ₃
G ₄	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	O ₄
G ₅	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	O ₅

G₁ = Grupo experimental formado por 5 ratones que recibió 250mg/kg de extracto flavonoídico de *Viola tricolor* L.

G₂ = Grupo experimental formado por 5 ratones que recibió 500mg/kg de extracto flavonoídico de *Viola tricolor* L.

G₃ = Grupo experimental formado por 5 ratones que recibió 750mg/kg de extracto flavonoídico de *Viola tricolor* L.

G₄ = Grupo experimental formado por 5 ratones que recibió fluoxetina a 20mg/kg.

G₅ = Grupo experimental formado por 5 ratones que recibió solución salina al 0.9% a 0.2ml/20g.

X_{1, 2, 3} = Dosis del extracto flavonoídico de *Viola tricolor* L. de 250mg/kg administrado cada 12 h.

X_{4, 5, 6} = Dosis del extracto flavonoídico de *Viola tricolor* L. de 500mg/kg administrado cada 12 h.

X_{7, 8, 9} = Dosis del extracto flavonoídico de *Viola tricolor* L. de 750mg/kg administrado cada 12 h.

X_{10, 11, 12} = Dosis de fluoxetina a 20mg/kg administrado cada 12 h.

X_{13, 14, 15} = Administración de solución salina al 0.9% a 0.2ml/20g administrado cada 12 h.

O_{1...O₅} = Mediciones del tiempo de inmovilidad, swimming y climbing en la prueba de nado forzado modificado después de 1 hora de administrado el último tratamiento, por un periodo de 5 minutos.

C. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA PARA LA FRACCIÓN MAYORITARIA FLAVONOÍDICA DE *Viola tricolor* L. “pensamiento”

Diseño con postprueba únicamente, dosis repetidas y grupo control:

Simbología:

G = Grupo

X = Tratamiento

O = Medición

G ₁	X ₁	X ₂	X ₃	O ₁
G ₂	X ₄	X ₅	X ₆	O ₂
G ₃	X ₇	X ₈	X ₉	O ₃
G ₄	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	O ₄
G ₅	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	O ₅

G₁ = Grupo experimental formado por 5 ratones que recibió 90mg/kg de fracción mayoritaria flavonoídica de *Viola tricolor* L.

G₂ = Grupo experimental formado por 5 ratones que recibió 180mg/kg de fracción mayoritaria flavonoídica de *Viola tricolor* L.

G₃ = Grupo experimental formado por 5 ratones que recibió 360mg/kg de fracción mayoritaria flavonoídica de *Viola tricolor* L.

G₄ = Grupo experimental formado por 5 ratones que recibió fluoxetina a 20mg/kg.

G₅ = Grupo experimental formado por 5 ratones que recibió solución salina al 0.9% a 0.2ml/20g.

X_{1, 2, 3} = Dosis de fracción mayoritaria flavonoídica de *Viola tricolor* L. de 90mg/kg administrado cada 12 h.

X_{4, 5, 6} = Dosis de fracción mayoritaria flavonoídica de *Viola tricolor* L. de 180mg/kg administrado cada 12 h.

X_{7, 8, 9} = Dosis de fracción mayoritaria flavonoídica de *Viola tricolor* L. de 360mg/kg administrado cada 12 h.

X_{10, 11, 12} = Dosis de fluoxetina a 20mg/kg administrado cada 12 h.

X_{13, 14, 15} = Administración de solución salina al 0.9% a 0.2ml/20g administrado cada 12 h.

O_{1...O₅} = Mediciones del tiempo de inmovilidad, swimming y climbing en la prueba de nado forzado modificado después de 1 hora de administrado el último tratamiento, por un periodo de 5 minutos.

3.4.3. IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES IMPLICADAS

A. VARIABLES INDEPENDIENTES

- ❖ Dosis del extracto etanólico de las partes aéreas de *Viola tricolor* L. “pensamiento” administrados por vía oral.
- ❖ Dosis del extracto flavonoídico de las partes aéreas de *Viola tricolor* L. “pensamiento” administrados por vía oral.
- ❖ Dosis de la fracción mayoritaria flavonoídica de las partes aéreas de *Viola tricolor* L. “pensamiento” administrados por vía oral.

B. VARIABLE DEPENDIENTE

- ❖ Actividad antidepresiva posterior a la administración de los extractos etanólico, flavonoídico y fracciones mayoritarias flavonoídicas de las partes aéreas de *Viola tricolor* L. “pensamiento”.

3.4.4. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

A. VARIABLE INDEPENDIENTE: DOSIS DEL EXTRACTO ETANÓLICO

a. **Definición conceptual:** Cantidad del extracto etanólico administrado por vía oral de acuerdo al peso de los animales de experimentación. (102)

b. **Definición operacional:**

- Naturaleza: Cuantitativa
- Forma de medición: Directa
- Escala de medición: Razón
- Instrumento de medición: Balanza analítica
- Procedimiento de medición: Se mide pesando la cantidad de extracto etanólico de la especie (*Viola tricolor* L.) de acuerdo al peso de los animales de experimentación a las dosis de 250, 500 y 750 mg/Kg de peso.
- Expresión final de la variable: mg/kg
- Indicador: Dosis administrada

B. VARIABLE INDEPENDIENTE: DOSIS DEL EXTRACTO FLAVONOÍDICO

a. **Definición conceptual:** Cantidad del extracto de flavonoides administrado por vía oral de acuerdo al peso de los animales de experimentación. (103)

b. **Definición operacional:**

- Naturaleza: Cuantitativa
- Forma de medición: Directa
- Escala de medición: Razón
- Instrumento de medición: Balanza analítica
- Procedimiento de medición: Se mide pesando la cantidad de extracto flavonoídico de la especie (*Viola tricolor* L.) de

acuerdo al peso de los animales de experimentación a las dosis de 250, 500 y 750 mg/Kg de peso.

- Expresión final de la variable: mg/kg
- Indicador: Dosis administrada

C. VARIABLE INDEPENDIENTE: FRACCIÓN MAYORITARIA FLAVONOÍDICA

a. Definición conceptual: Dosis de la fracción rica en flavonoides administrado por vía oral de acuerdo al peso de los animales de experimentación (2 fracciones). (104)

b. Definición operacional:

- Naturaleza: Cuantitativa
- Forma de medición: Directa
- Escala de medición: Razón
- Instrumento de medición: Balanza analítica
- Procedimiento de medición: Se mide pesando la cantidad de la fracción mayoritaria flavonoídica de la especie (*Viola tricolor* L.) de acuerdo al peso de los animales de experimentación a las dosis de 90, 180 y 360 mg/Kg de peso.
- Expresión final de la variable: mg/kg
- Indicador: Dosis administrada

D. VARIABLE DEPENDIENTE: ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA

a. Definición conceptual: Es el restablecimiento a la normalidad de todo estado emocional anormal caracterizado por un exceso de sentimiento de tristeza, melancolía, desanimo, desmerito, vacío y desesperanza, en grado inapropiado y desproporcionado respecto a la realidad. (105)

Indicador: Tiempo de inmovilidad

a. Definición conceptual: Tiempo en el cual el animal deja de luchar y solo se observa movimientos necesarios para mantener su cabeza por encima del nivel de agua. (87)

b. Definición operacional:

- Naturaleza: Cuantitativa
- Forma de medición: Directa
- Escala de medición: Razón
- Instrumento de medición: Cronometro y cámara digital
- Procedimiento de medición: La actividad antidepresiva se mide determinando la reducción del tiempo de inmovilidad de los ratones sometidos a la prueba de nado forzado modificado una hora después de la administración de los extractos.
- Expresión final de la variable: Segundos

Indicador: Tiempo de swimming

a. Definición conceptual: Tiempo en el cual el animal presenta movimientos usualmente horizontales. (87)

b. Definición operacional:

- Naturaleza: Cuantitativa
- Forma de medición: Directa
- Escala de medición: Razón
- Instrumento de medición: Cronometro y cámara digital
- Procedimiento de medición: El mecanismo de acción se mide determinando la duración del tiempo de swimming de los ratones sometidos a la prueba de nado forzado modificado una hora después de la administración de los extractos.
- Expresión final de la variable: Segundos

Indicador: Tiempo de climbing

a. Definición conceptual: Tiempo en el cual el animal presenta movimientos verticales. (87)

b. Definición operacional:

- Naturaleza: Cuantitativa
- Forma de medición: Directa
- Escala de medición: Razón
- Instrumento de medición: Cronometro y cámara digital
- Procedimiento de medición: El mecanismo de acción se mide determinando la duración del tiempo de climbing de los ratones sometidos a la prueba de nado forzado modificado una hora después de la administración de los extractos.
- Expresión final de la variable: Segundos

E. VARIABLES INTERVINIENTES

a. De los animales de experimentación:

- Especie: Ratones albinos de la especie *Mus músculus*, cepa balb/c/CNPB.
- Edad: De 2 a 3 meses.
- Sexo: Macho.
- Peso: 20 – 25g
- Alimentación: Todos los animales de experimentación han sido mantenidos bajo las mismas condiciones de libre acceso a agua y alimento, y se les ha dado diariamente comida estándar para roedores proveído por el bioterio de procedencia.
- Ambiente adecuado de crianza y experimentación: Los animales han sido mantenidos en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica a una temperatura de 20 ± 2 °C, con un ciclo

artificial de luz/oscuridad de 12:12 horas. Las jaulas han sido secadas y limpiadas diariamente.

b. De la planta en estudio:

- Partes recolectadas y utilizadas: Se colectaron y utilizaron las partes aéreas de *Viola tricolor* L.
- Secado del material vegetal: Se realizó el secado de las partes aéreas de *Viola tricolor* L. en un ambiente ventilado y protegido de la luz solar.
- Madurez de la planta: Se recolectó las plantas en etapa de florecimiento.
- Zonas de recolección: Se recolectó en zonas libres de contaminación de insecticidas. La especie *Viola tricolor* L. “pensamiento” ha sido recolectado en la comunidad de Janac Chuquibamba, distrito de Lamay, provincia de Calca, Cusco.

c. Del extracto etanólico:

- Tipo de extracción: El material vegetal ha sido extraído por maceración.
- Solvente: Se utilizó etanol al 70% como solvente.
- Tiempo de extracción: Se realizó una maceración de 15 días.
- Temperatura de extracción: La extracción se realizó a temperatura ambiente.
- Evaporación de los solventes: El extracto crudo etanólico ha sido evaporado a sequedad bajo condiciones de presión reducida.

d. Del extracto flavonoídico:

- Tipo de extracción: El material vegetal ha sido extraído por extracción por sonicación.
- Solvente: Se utilizó cloroformo y metanol como solvente.
- Tiempo de extracción: Se realizó en 80 minutos.
- Temperatura de extracción: La extracción se realizó a 30°C.

- Evaporación de los solventes: El extracto clorofórmico fue desechado y luego se agrega metanol el cual se evaporó a sequedad a presión reducida.

e. De las fracciones mayoritarias flavonoídicas:

- Método: Las fracciones mayoritarias flavonoídicas se separaron por Cromatografía en Columna.
- Fase estacionaria: Diaion® HP-20
- Fase móvil: Gradiente de agua destilada – metanol.
- Velocidad de flujo: 1ml/min

f. De la administración de los extractos:

- Vía de administración: Los extractos fueron administrados por vía oral.
- Vehículo: Se utilizó solución salina al 0.9%

F. VARIABLES SUBJETIVAS

Las variables subjetivas fueron eliminadas debido a que el estudio fue de tipo simple ciego. Se recurrió a etiquetar los diferentes tratamientos con códigos, en la que solo uno de los investigadores sabía dichos códigos, mientras que el otro lo desconocía.

VARIABLES IMPLICADAS

Variables Implicadas								
Variables	Definición conceptual	Naturaleza	Forma de medición	Escala de medición	Instrumento de medición	Expresión final de la variable	Indicador	
Independiente	Dosis del extracto etanólico	Cantidad del extracto etanólico administrado por vía oral de acuerdo al peso de los animales de experimentación.	Cuantitativa	Directa	Razón	Balanza analítica	mg/kg	Dosis administrada
	Dosis del extracto flavonoídico	Cantidad del extracto de flavonoides administrado por vía oral de acuerdo al peso de los animales de experimentación	Cuantitativa	Directa	Razón	Balanza analítica	mg/kg	Dosis administrada
	Fracción mayoritaria flavonoídica	Dosis de la fracción rica en flavonoides administrado por vía oral de acuerdo al peso de los animales de experimentación (2 fracciones).	Cuantitativa	Directa	Razón	Balanza analítica	mg/kg	Dosis administrada
Dependiente	Actividad antidepresiva	Cuando el ratón deja de luchar y no se observa movimientos adicionales que la requerida para mantener la cabeza del ratono por encima del agua.	Cuantitativa	Directa	Razón	Cronómetro	Segundos	Tiempo de inmovilidad
		Son movimientos usualmente horizontales que también incluye cruzar de un cuadrante a otro.	Cuantitativa	Directa	Razón	Cronómetro	Segundos	Tiempo de swimming
		Son movimientos rápidos de las extremidades anteriores de manera que las patas delanteras rompan la superficie del agua.	Cuantitativa	Directa	Razón	Cronómetro	Segundos	Tiempo de climbing

VARIABLES NO IMPLICADAS

Variables Intervinientes		
De los animales de experimentación	Especie	Ratones albinos de la especie <i>Mus músculus</i> , cepa balb/c/CNPB.
	Edad	2 - 3 meses
	Sexo	Macho
	Peso	20 - 25g
	Alimentación	Libre acceso a agua y alimento/ comida estándar para roedores
	Ambiente de crianza y experimentación	Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica a una T° de 20 ± 2°C, con un ciclo artificial de luz/oscuridad de 12:12h
De la planta en estudio	Partes recolectadas y utilizadas	Partes áreas del material vegetal
	Secado	Ambiente ventilado y protegido de la luz solar
	Madurez	Eta de florecimiento de la especie vegetal
	Zonas de recolección	Comunidad de Janac Chuquibamba, distrito de Lamay, provincia de Calca, Cusco
Del extracto etanólico	Tipo de extracción	Extracción por maceración
	Solvente	Etanol al 70%
	Tiempo de extracción	15 días
	Temperatura de extracción	Temperatura ambiente
	Evaporación de los solventes	Evaporados a sequedad bajo condiciones de presión reducida
Del extracto flavonoídico	Tipo de extracción	Extracción por sonicación
	Solvente	Cloroformo y metanol
	Tiempo de extracción	80 minutos
	Temperatura de extracción	30°C
	Evaporación de los solventes	Evaporados a sequedad a presión reducida
De las fracciones mayoritarias flavonoídicas	Método	Cromatografía en Columna
	Fase estacionaria	Diaion® HP-20
	Fase móvil	Gradiente de agua destilada – metanol
	Velocidad de flujo	1ml/min
De la administración de los extractos	Vía de administración	Vía oral
	Vehículo	Solución salina al 0.9%.

3.4.5. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

A. TÉCNICAS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

- Se observó en el laboratorio las reacciones de la solubilidad en diferentes solventes y el análisis fitoquímico cualitativo de los extractos.
- Se observó en el laboratorio la conducta de los animales de experimentación para obtener la medición del tiempo de climbing, swimming e inmovilidad en la prueba de nado forzado modificado.

B. INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

- Para la prueba de solubilidad: Se utilizó ficha estructurada para la recolección de datos de las pruebas de solubilidad (**ANEXO N° 3**).
- Para el análisis fitoquímico cualitativo: Se utilizó ficha estructurada para la recolección de datos del análisis fitoquímico cualitativo (**ANEXO N° 4**).
- Se realizó cromatografía en columna para aislar las fracciones flavonoídicas.
- Se utilizaron fichas de recolección de datos para la medición del tiempo de climbing, swimming e inmovilidad en la prueba de nado forzado modificado (**ANEXO N° 5**).
- Se realizó espectroscopía UV/Visible para identificar los principales tipos de flavonoides presentes en las fracciones flavonoídicas.

3.4.6. PROCESAMIENTO DE DATOS

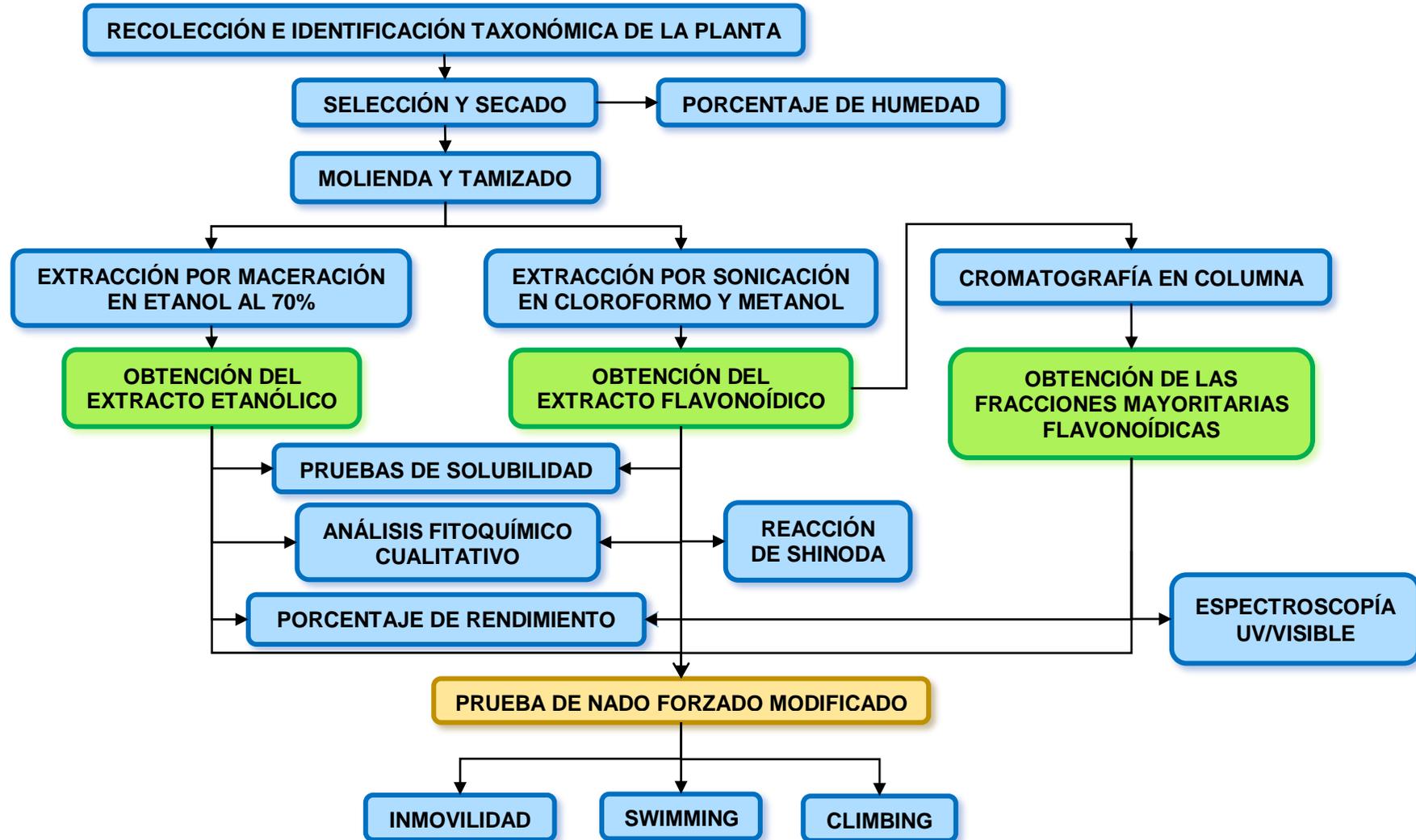
El procesamiento de los datos se realizó mediante el Software estadístico IBM SPSS Statistics Base 22.0 (Statistical Package for the Social Sciences) donde se obtuvieron:

- Los estadísticos descriptivos que fueron el mínimo, el máximo, la media y la desviación estándar para cada uno de los grupos.

- La prueba de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk, la cual se utiliza cuando el tamaño de la muestra es menor que 50 datos, por ello no se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov que es para un mayor tamaño de muestra.
- La prueba paramétrica Análisis de varianza (ANOVA) parte de una distribución normal, por ello el ANOVA de una vía se utilizó para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los diferentes grupos. Un nivel de probabilidad de 0.05 o menos ($p < 0.05$) fue considerado como significativo.
- La prueba post-hoc de Duncan se utilizó para realizar comparaciones múltiples entre las medias.
- Para la elaboración de los gráficos también se utilizó IBM SPSS Statistics 22.0.

3.5. PROCEDIMIENTOS DE LA INVESTIGACIÓN

FLUJOGRAMA N° 1: Procedimientos de la investigación.



Fuente: Elaboración propia.

3.5.1. MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL

A. UBICACIÓN

La especie *Viola tricolor* L. “pensamiento” se recolectó en el mes de Enero, en la comunidad de Janac Chuquibamba (altura: 2941 m.s.n.m.; coordenadas geográficas: S 13° 21’ 44.30”; O 71° 54’ 32.702”), distrito de Lamay, provincia de Calca, Cusco.

B. RECOLECCIÓN

La especie vegetal se recolectó en bolsas de papel Kraft durante las primeras horas de la mañana, agregándoles etanol para estabilizar los metabolitos secundarios.

C. SELECCIÓN

El material de la especie vegetal se seleccionó cuidadosamente, tomando en cuenta que las partes aéreas (flores y tallos) estén enteras y libres de partículas de polvo, manchas, insectos u hongos.

D. SECADO

Las muestras se sometieron a un proceso de secado sobre papel kraft en un área ventilada y sombreada a temperatura ambiente por un período de 15 días. Se preparó 3 ejemplares de la especie vegetal para su identificación taxonómica por el Herbario Vargas. Una vez obtenidas las muestras secas se realizó la molienda en un molino de granos.

3.5.2. PORCENTAJE DE HUMEDAD

La determinación del porcentaje de humedad se realizó por triplicado mediante el método gravimétrico, en placas Petri con 10g de muestra fresca trozada, las cuales se introdujeron a la estufa a una temperatura de 100°C hasta conseguir un peso constante para luego determinar el porcentaje de humedad mediante la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100$$

Donde:

% H = Porcentaje de humedad

M₁ = Peso de muestra fresca

M₂ = Peso de muestra seca

3.5.3. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

El porcentaje de rendimiento de extracción de la especie vegetal se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%E = \frac{Pf}{Pi} \times 100$$

Donde:

% E = Porcentaje de rendimiento

Pf = Peso final (extracto seco)

Pi =Peso inicial (muestra molida)

3.5.4. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Para la realización de las pruebas de solubilidad, los extractos (etanólico y flavonoídico) de la especie vegetal se colocaron en diferentes tubos de ensayo y luego se les añadieron solventes de diferentes polaridades, ordenados en forma descendente del más polar al menos polar (agua destilada, metanol, etanol al 40%, etanol al 70%, etanol al 90%, acetato de etilo, acetona, cloroformo y hexano); para así determinar la naturaleza disolutiva de los extractos a temperatura ambiente.

3.5.5. ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

Para la realización de la marcha fitoquímica se utilizó reacciones de coloración que determinó la presencia de metabolitos secundarios en los extractos etanólico y flavonoídico de la especie vegetal en estudio como se muestran a continuación:

TABLA N° 10: Análisis Fitoquímico Cualitativo.

Metabolito secundario	Reactivo
Alcaloides	Dragendorff
Azúcares reductores	Fehling
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico
Esteroides	Liebermann – Burchard
Flavonoides	Shinoda
Glicósidos	Fehling
Lactonas sesquiterpénicas	Baljet
Quinonas	Ácido sulfúrico
Saponinas	Afrosimétrico
Taninos	Gelatina - sal

Fuente: Elaboración propia.

3.6. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO

Se tomaron 200g del material seco y molido de las partes aéreas de la especie *Viola tricolor* L., el cual se sometió a un proceso de extracción por maceración con etanol al 70% en una relación de 1:2, durante un período de 15 días con agitación constante, a temperatura ambiente en un frasco de color ámbar. Los extractos fueron filtrados y concentrados en un rotavapor a una temperatura de 40°C a presión de 175mbar. Luego los extractos fueron transferidos en envases de boca ancha depositados posteriormente en Baño María a 40°C para completar la evaporación del solvente residual.

3.7. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO FLAVONOÍDICO

3.7.1. EXTRACCIÓN POR SONICACIÓN

300g de la muestra seca y recién pulverizada de *Viola tricolor* L. se sometió dos veces con cloroformo durante 25 minutos en un baño de ultrasónidos a 30°C. El extracto fue filtrado, posteriormente se desechó el extracto de cloroformo obtenido. El residuo vegetal se secó a temperatura ambiente y se volvió a extraer dos veces con metanol durante 15 minutos en un baño de ultrasónidos a 30°C. Se volvió a filtrar, el filtrado fue concentrado en un rotavapor a una temperatura de 40°C a presión de 337mbar. Luego los extractos fueron transferidos en envases de boca ancha depositados posteriormente en Baño María a 40°C para completar la evaporación del solvente residual, obteniéndose el extracto flavonoídico.

3.7.2. REACCIÓN DE SHINODA

Al extracto flavonoídico disuelto en agua destilada, se le agregó limadura de magnesio metálico más 2 a 3 gotas de HCl concentrado, el desarrollo inmediato de coloración fue indicativo de la presencia de flavonoides.

3.8. OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES FLAVONOÍDICAS

3.8.1. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Para aislar las fracciones flavonoídicas se procedió de acuerdo al método de cromatografía en columna, se eligió las dos fracciones mayoritarias teniendo en cuenta el porcentaje de rendimiento.

A. FASE ESTACIONARIA

La fase estacionaria se preparó con la resina Diaion® HP-20 (matriz rígida de poliestireno – divinilbenceno) (**ANEXO N° 6**) certificada por el proveedor SUPELCO (**ANEXO N° 7**). Por indicación del proveedor se procedió a humectar la resina seca (**ANEXO N° 8**), se pesó 30g de resina seca luego se agregó metanol hasta cubrir la cama de resina, se removió suavemente por un minuto para asegurar una mezcla completa y se dejó en reposo durante 15 minutos. Se decantó la mayor parte del metanol y se reemplazó con agua destilada, finalmente se dejó reposar durante 5 a 10 minutos.

La suspensión de resina se vertió lentamente a la columna, luego el exceso de agua se drenó por la parte inferior de la columna.

B. FASE MÓVIL

La fase móvil consistió en un gradiente de solventes (agua destilada – metanol) de la siguiente forma:

TABLA N° 11: Gradiente de solventes utilizados en CC.

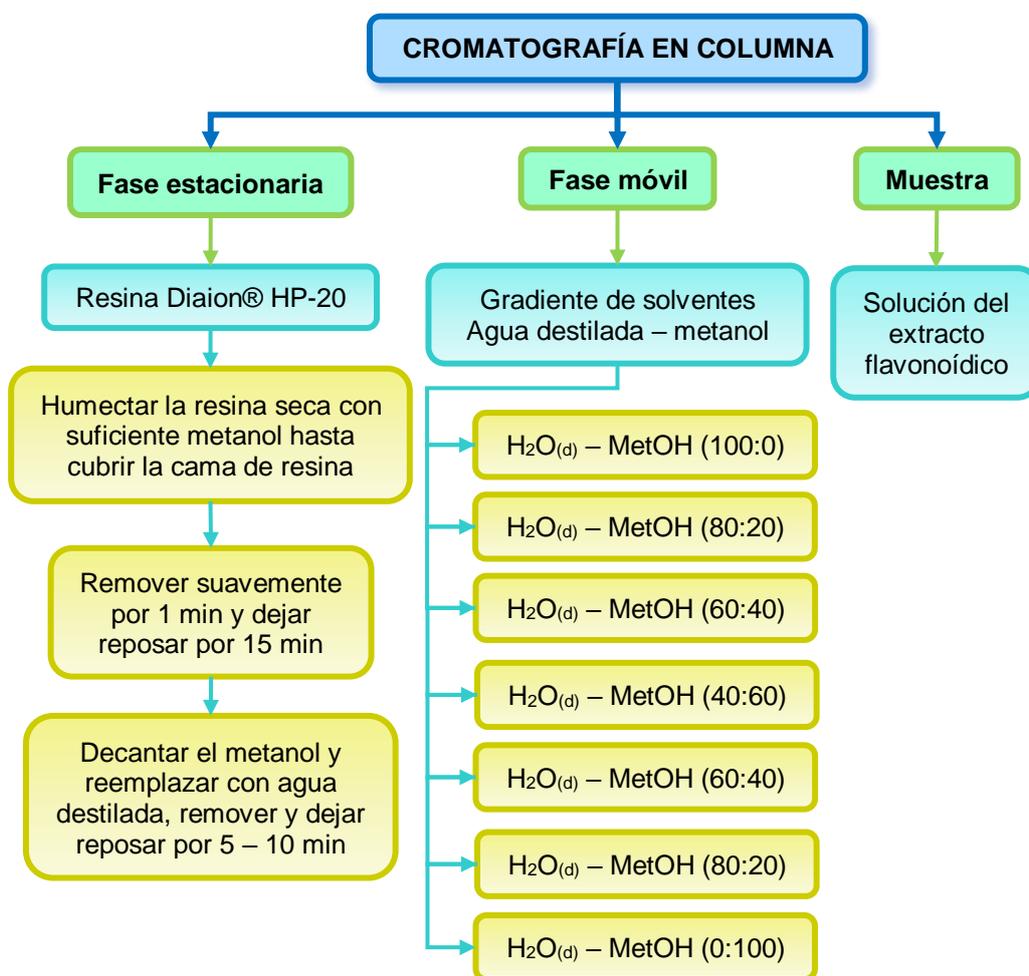
Gradiente de solventes	Volumen (ml)
Agua destilada – metanol (100:0)	100
Agua destilada – metanol (80:20)	100
Agua destilada – metanol (60:40)	100
Agua destilada – metanol (40:60)	100
Agua destilada – metanol (20:80)	100
Agua destilada – metanol (0:100)	100

Fuente: Elaboración propia.

C. MUESTRA

Se tomaron 8g del extracto flavonoídico y se disolvió en agua destilada, luego se agregó la disolución a la columna preparada.

FLUJOGRAMA N° 2: Procedimiento de CC.



Fuente: Elaboración propia.

3.8.2. ESPECTROSCOPIA UV/VIS

Las fracciones obtenidas en la cromatografía en columna se concentraron en baño María, luego se disolvió en metanol y se procedieron a analizarlos por espectroscopía UV/Vis, para determinar el tipo de flavonoide que presenta cada fracción.

3.9. MODELO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA

3.9.1. PRUEBA DE NADO FORZADO MODIFICADO EN RATONES

Se usaron 100 ratones albinos machos de la especie *Mus musculus*, cepa Balb/c/CNPB con un peso promedio entre 20-25g provenientes del INS, los cuales se mantuvieron en un entorno de temperatura ambiente con un ciclo de oscuridad/luz de 12:12 horas. Alimento y agua estuvieron disponibles a voluntad. Los ratones fueron experimentalmente nuevos y se utilizaron sólo una vez.

Los extractos, las fracciones aisladas de *Viola tricolor* L. y el medicamento innovador Prozac® 20mg (fluoxetina) fueron suspendidas en una solución salina al 0.9% y administrados por vía oral. El grupo control recibió sólo la solución salina a una dosis de 0.2ml/20g de peso corporal y fueron sometidos a las mismas condiciones que los grupos experimentales.

El método utilizado inicialmente fue descrito por PORSOLT *et al.* La prueba de nado forzado modificado consistió en dos sesiones:

La primera sesión fue la adaptación de los ratones en el agua. Se colocaron a los ratones marcas de identificación en las colas de los animales con tinta indeleble. Se pesaron a los ratones e inmediatamente se les colocó en cubetas rectangulares de vidrio (altura: 35cm, largo: 20cm y ancho: 20cm) conteniendo agua hasta 13cm a una temperatura de 25°C ± 1 por un periodo de 15 minutos, inmediatamente fueron secados con toallas. Se cambió el agua

después de cada sesión para evitar cualquier influencia en el siguiente ratón.

A los 60 minutos después de terminada la primera sesión se les administró el tratamiento apropiado vía oral. Se realizaron tres administraciones cada 12 horas (1° dosis 8:30 h, 2° dosis 20:30 h y 3° 8:30 h) de los extractos, del fármaco patrón fluoxetina y del grupo control a las dosis escogidas antes de la segunda sección de nado.

La segunda sesión fue la evaluación de los parámetros. 24 horas después de la sesión de adaptación se realizó la segunda sesión que fue grabada con una cámara digital, donde se colocó en la cubeta de vidrio a cada animal por un período de 5 minutos, en el cual se evaluaron los siguientes parámetros:

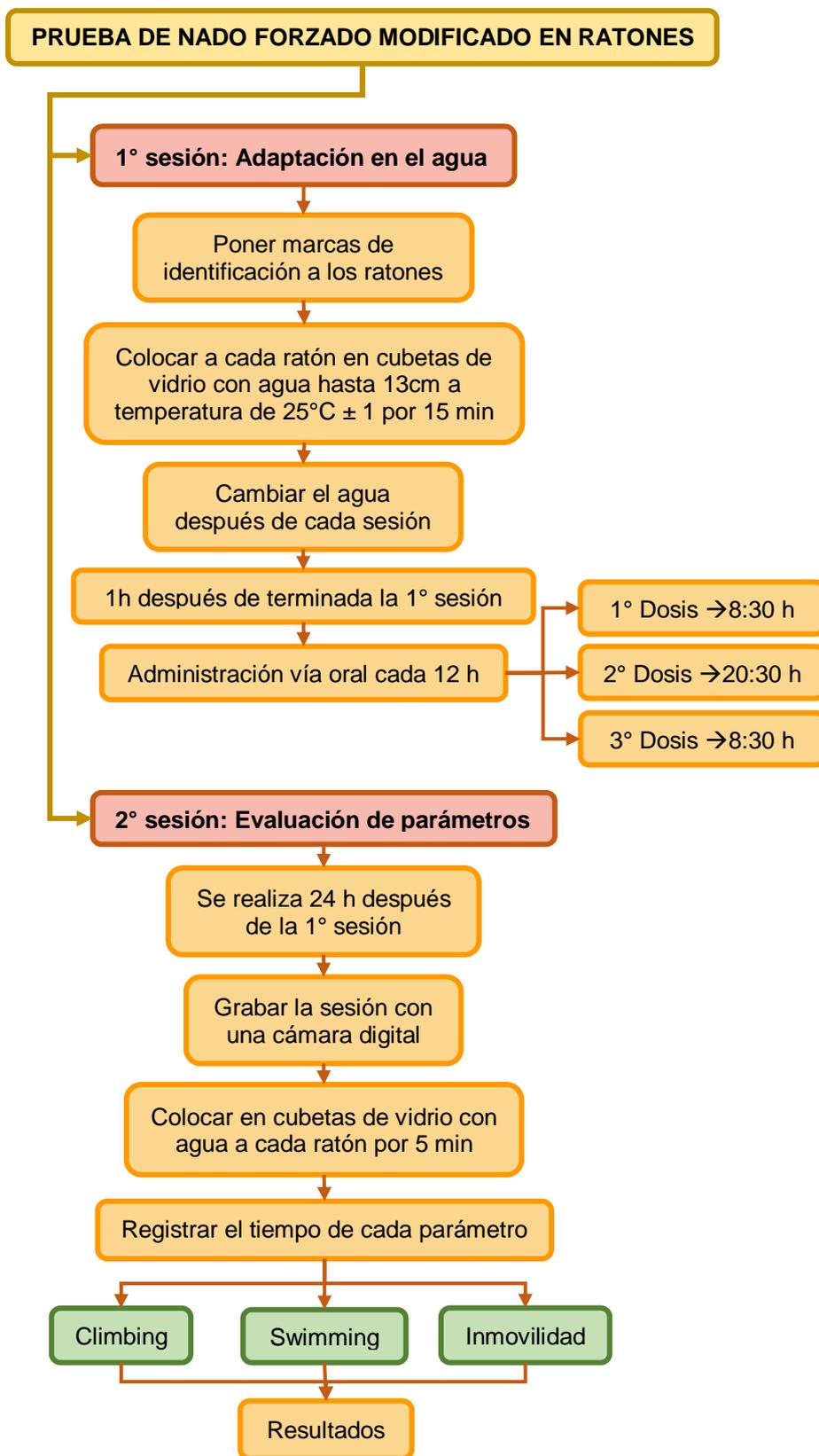
- ❖ Climbing: Son movimientos rápidos de las extremidades anteriores de manera que las patas delanteras rompan la superficie del agua.
- ❖ Swimming: Son movimientos usualmente horizontales que también incluye cruzar de un cuadrante a otro.
- ❖ Inmovilidad: Cuando el ratón deja de luchar y no se observa movimientos adicionales que la requerida para mantener la cabeza del ratón por encima del nivel de agua. Parámetro inicialmente medido por Porsolt en la FST tradicional.

El tiempo que duró cada parámetro realizados por cada ratón en un periodo de 5 minutos se registró en intervalos de 5 segundos a lo largo de la sesión de evaluación.

3.9.2. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los investigadores que experimentan están moralmente obligados al respeto por la vida de los animales, por ello aparte de obtener resultados experimentales, se minimizó cualquier dolor o angustia de los ratones utilizados en la presente investigación de acuerdo a los principios dados por el INS (**ANEXO N° 9**), además se tomó en cuenta la reglas de las 3R's: Reducción, refinamiento y reemplazo.

FLUJOGRAMA N° 3: Procedimiento de la FST modificado en ratones.



Fuente: Elaboración propia.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y

DISCUSIÓN DE

RESULTADOS

4.1.DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD

Se determinó mediante el método gravimétrico, realizando tres determinaciones de las partes aéreas de *Viola tricolor* L., obteniéndose los siguientes resultados.

TABLA N° 12: PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LAS PARTES AÉREAS DE *Viola tricolor* L. “pensamiento”

N° DE DETERMINACIONES	PESO DE MUESTRA FRESCA (g)	PESO DE MUESTRA SECA (g)	PORCENTAJE DE HUMEDAD (%)
1	10.005	1.375	86.26
2	10.003	1.388	86.12
3	10.005	1.416	85.85
PROMEDIO			86.08

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 12 se observa que para el porcentaje de humedad de la especie *Viola tricolor* L. se hicieron tres determinaciones dando como resultado un promedio de 86.08% de humedad, este valor refleja el alto contenido de agua presente en la especie vegetal.

Mishra et al., 2014, determinaron que *Viola tricolor* L. tiene 81.04% de humedad, un valor menor obtenido de acuerdo a nuestro estudio, lo que significaría que este valor puede determinar ciertas diferencias entre la especie por ubicación geográfica. (106)

4.2. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

Para determinar el porcentaje de rendimiento de extracción se tomó en cuenta el peso del extracto seco extraído de la muestra y se correlacionó con la cantidad de extracto crudo que se tiene en un principio.

**TABLA N° 13: PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LAS PARTES
AÉREAS DE *Viola tricolor* L. “pensamiento”**

MUESTRA	PESO DE MUESTRA MOLIDA (g)	PESO DE EXTRACTO SECO (g)	PORCENTAJE DE RENDIMIENTO (%)
Extracto etanólico al 70%	200	37.68	18.84
Extracto flavonoídico	300	21.34	7.11
FR1	8	1.135	14.19
FR2	8	0.94	11.75
FR3	8	0.656	8.20
FR4	8	0.099	1.24
FR5	8	0.017	0.21
FR6	8	0.223	2.79
FR7	8	0.018	0.23

Fuente: Datos experimentales del estudio.

Leyenda:

FR1: Fracción 1

FR2: Fracción 2

FR3: Fracción 3

FR4: Fracción 4

FR5: Fracción 5

FR6: Fracción 6

FR7: Fracción 7

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 13 se observa que el porcentaje de rendimiento obtenido por maceración con etanol al 70% para el extracto etanólico de las partes aéreas de *Viola tricolor* L. fue de 18.84%. Witkowska-Banaszczak et al., 2005, obtuvieron un 14.71% para el extracto etanólico de *Viola tricolor*, dato diferente a nuestro estudio. (107)

Por otro lado, Rahimi et al., 2017, en el extracto hidroalcohólico de *Viola tricolor*, obtuvieron un rendimiento de 20%, cifra que se asemeja a nuestro estudio. (27) Sadeghnia et al., 2014, determinaron que el extracto hidroalcohólico de *Viola tricolor* presenta un rendimiento de 32%, este resultado es mayor en comparación a nuestro estudio. (108) Ambos estudios utilizan el método Soxhlet, con etanol al 70%, pudiéndose notar la diferencia entre métodos.

El porcentaje de rendimiento obtenido por sonicación con cloroformo y metanol para el extracto flavonoídico de las partes aéreas de *Viola tricolor* L. fue de 7.11%.

El orden de % de rendimiento para las fracciones flavonoídicas fue el siguiente: FR1 > FR2 > FR3 > FR6 > FR4 > FR7 > FR5. Se obtuvieron que las dos fracciones mayoritarias son la FR1 y FR2 con 14.19 y 11.75% respectivamente, pero la FR1 es una fracción susceptible a contaminación microbiana ya que el solvente por el cual fue arrastrado fue agua, por lo que es difícil determinar la actividad antidepresiva por lo que se prefirió trabajar con la FR2 y FR3 (8.20%). Witkowska-Banaszczak et al., 2005, obtuvieron un 0.91% para la fracción de metanol de *Viola tricolor*, mediante extracción Soxhlet, resultado que comparando con nuestras fracciones son similares con respecto a concentraciones bajas obtenidas para la mayoría de las fracciones flavonoidicas. (107)

Estos datos permiten determinar la cantidad de muestra vegetal que se requiere para la realización de diferentes ensayos del estudio, además nos da información para saber si la planta es una buena materia prima o no para obtener productos a gran escala.

4.3. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Para la determinación de las pruebas de solubilidad del extracto etanólico y flavonoídico de *Viola tricolor* L. “pensamiento” se utilizaron diferentes solventes de diferente polaridad obteniéndose los siguientes resultados.

TABLA N° 14: RESULTADOS DE LA SOLUBILIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% Y FLAVONOÍDICO DE *Viola tricolor* L. “pensamiento”

PRUEBAS DE SOLUBILIDAD		
SOLVENTE	EXTRACTO ETANÓLICO AL 70%	EXTRACTO FLAVONOÍDICO
Agua destilada	++	+++
Metanol	+++	+++
Etanol al 40%	+++	+++
Etanol al 70%	+++	+++
Etanol al 90%	+	++
Acetato de etilo	-	-
Acetona	-	-
Cloroformo	-	-
Hexano	-	-

Fuente: Datos experimentales del estudio.

Leyenda:

Muy soluble	+++
Soluble	++
Poco soluble	+
Insoluble	-

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N°14 muestra la solubilidad de los extractos etanólicos y flavonoídico de las partes aéreas de *Viola tricolor* L., en diferentes solventes, empezando del solvente más polar al menos polar.

Se observó que el extracto etanólico de *Viola tricolor* L. es muy soluble en metanol, etanol al 40 y 70%; soluble en agua destilada; poco soluble en etanol al 90% e insoluble en acetato de etilo, acetona, cloroformo y hexano; lo que demuestra que en el extracto se encuentran metabolitos de naturaleza polar.

Se observó que el extracto flavonoídico de *Viola tricolor* L. es muy soluble en agua destilada, metanol, etanol al 40 y 70%; soluble en etanol al 90% e insoluble en acetato de etilo, acetona, cloroformo y hexano; lo que demuestra que en el extracto se encuentran metabolitos de naturaleza polar.

En la literatura podemos encontrar que varios autores Witkowska-Banaszczak et al., 2005 (107), Vukics et al., 2008 (37), Ghorbani et al., 2012 (25), Piana et al., 2013 (33), Rahimi et al., 2017 (27), Harati et al., 2018 (26), utilizaron solventes de naturaleza polar como agua destilada, metanol, etanol para realizar sus investigaciones en *Viola tricolor* L., lo que indicaría que estos se disuelven en solventes polares. Aunque autores como Witkowska-Banaszczak et al., 2005 (107), Ghorbani et al., 2012 (25), Rahimi et al., 2017 (27), utilizaron acetato de etilo como solvente, lo cual no coincide con nuestro estudio.

4.4. ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

Los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico y flavonoídico de las partes aéreas (flores y tallo) de *Viola tricolor* L. “pensamiento” en los cuales se obtuvieron los siguientes resultados.

TABLA N° 15: ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% Y FLAVONOÍDICO DE *Viola tricolor* L. “pensamiento”

ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO			
METABOLITOS SECUNDARIOS	REACTIVO	EXTRACTO ETANÓLICO AL 70%	EXTRACTO FLAVONOÍDICO
Alcaloides	Dragendorff	-	-
Azúcares reductores	Fehling	++	++
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico	+++	+++
Esteroides	Liebermann-Burchard	+	-
Flavonoides	Shinoda	+++	+++
Glicósidos	Fehling	++	+
Lactonas sesquiterpénicas	Baljet	-	-
Quinonas	H ₂ SO ₄	+++	+++
Saponinas	Espuma	+	-
Taninos	Gelatina	++	++

Fuente: Datos experimentales del estudio.

Leyenda:

Abundante cantidad	+++
Moderada cantidad	++
Escasa cantidad	+
Negativo	-

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 15 se puede observar que el extracto etanólico de *Viola tricolor* L., presenta abundante cantidad de compuestos fenólicos, flavonoides y quinonas; presenta en moderada cantidad azúcares reductores, glicósidos y taninos; en escasa cantidad esteroides y saponinas; ausencia en alcaloides y lactonas sesquiterpénicas. Piana et al., 2012, reportaron que el extracto hidroalcohólico (70% de etanol) de flores cortadas de *V. tricolor* L. presenta una cantidad considerable de polifenoles y flavonoides, presenta taninos condensados en moderada concentración, pero también pequeñas cantidades de alcaloides a diferencia de nuestro estudio. (33) Además Toiu et al., 2009, establecieron el contenido de saponinas, mucílago y carotenoides totales, expresados en β -caroteno. En partes aéreas frescas, determinaron por HPLC: violaxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina, β -caroteno 5,6-epóxido, β -caroteno y 9Z- β -caroteno. (109)

En la tabla N° 15 se puede observar que el extracto flavonoídico de *Viola tricolor* L., presenta abundante cantidad de compuestos fenólicos, flavonoides y quinonas; presenta en moderada cantidad azúcares reductores y taninos; en escasa cantidad glicósidos; ausencia en alcaloides, esteroides, lactonas sesquiterpénicas y saponinas. Según Vukics et al., 2008, determinaron los dos componentes principales de los flavonoides del extracto de metanol crudo de *Viola tricolor* L. los cuales fueron la violantina (6-C-glucosil-8-C-ramnosil apigenina) y la rutina (3-O-rutinosil quercetina). (37)

También Witkowska-Banaszczak et al., 2005, ha descrito a *Viola tricolor* L. como una fuente rica de terpenoides, compuestos fenólicos, flavonoides y saponinas. (107)

Toiu et al., 2009, en un examen fitoquímico realizado sobre *Viola tricolor* L. condujo a la identificación de terpenoides, carotenoides, ácidos grasos (en solución de cloroformo), de taninos, saponinas triterpénicas, flavonoides (en solución de metanol) y polisacáridos, aminoácidos, carbohidratos (en solución de agua). (109)

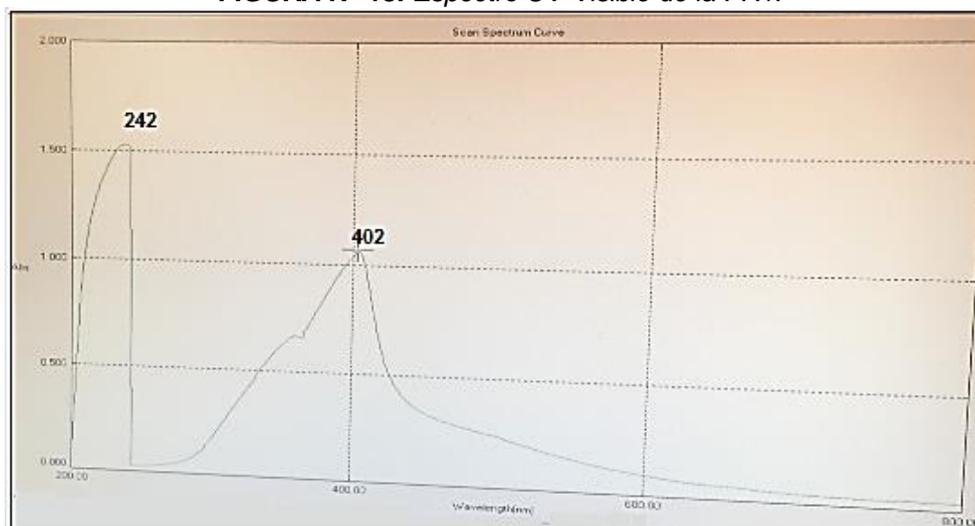
El extracto flavonoídico de *Viola tricolor* L. representa una extracción más selectiva en comparación con la extracción realizada con etanol, ya que de algún modo esta extracción no arrastra ciertos metabolitos y se evidencia porque existe disminución de metabolitos en el caso de glicósidos o ausencia en el caso de esteroides y saponinas. Según Valencia et al., 2017, los compuestos fenólicos o polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas que presentan estructura molecular similar, por ello existe un amplio grupo de moléculas pertenecientes a este grupo que van desde estructuras simples hasta complejas, se encuentran los flavonoides, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, polifenoles volátiles, estilbenos y compuestos diversos (lignanos y cumarinas). También se clasifican acorde al número de anillos fenólicos y los elementos estructurales unidos a las unidades básicas, siendo los principales grupos de compuestos fenólicos, los flavonoides, ácidos fenólicos, taninos hidrolizables, taninos condensados, estilbenos y lignanos. (110) Por ello el análisis fitoquímico cualitativo muestra compuestos fenólicos, flavonoides y taninos en el extracto flavonoídico.

Vukics V., 2009, desarrolló un fraccionamiento en el extracto metanólico (obtenido por sonicación en cloroformo y metanol) mediante cromatografía en columna convencional con Sephadex LH-20, obteniendo glucósidos de flavonoides. (35) El extracto flavonoídico realizado en el presente estudio está basado en la realizada por Vukics, es por ello que se evidencia presencia de glicósidos en el análisis fitoquímico.

Además, según Cai et al., 2004, las quinonas también son una clase importante de fenólicos, que se presentan solo en las hierbas medicinales (111), por otro lado Martínez et al., 2000, afirma que la presencia de oxígeno y la actividad de la enzima polifenol oxidasa cataliza la reacción entre un grupo fenol y el oxígeno para dar agua y quinona. (112)Entonces la presencia de quinonas en el extracto flavonoídico es probable que se deba a una reacción de oxidación.

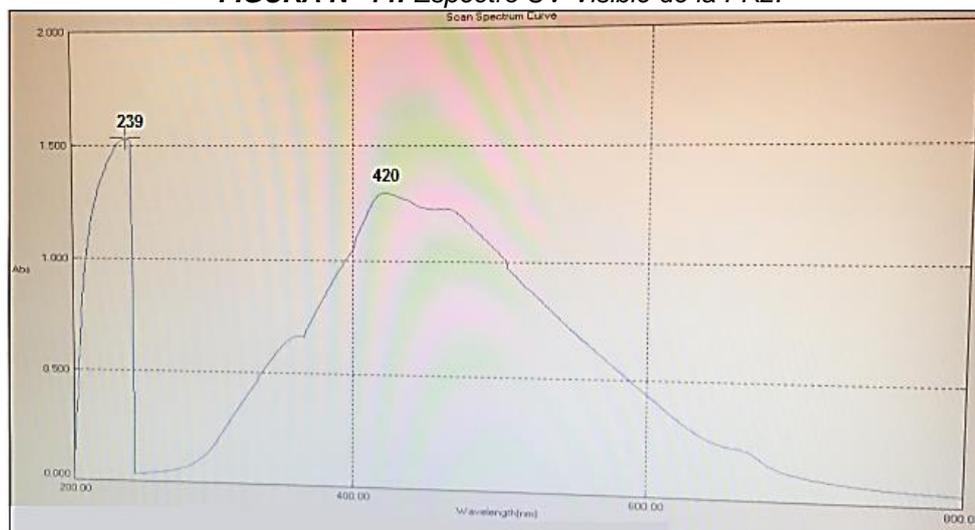
4.5. IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES POR ESPECTROSCOPÍA UV/VIS

FIGURA N° 13: Espectro UV-Visible de la FR1.



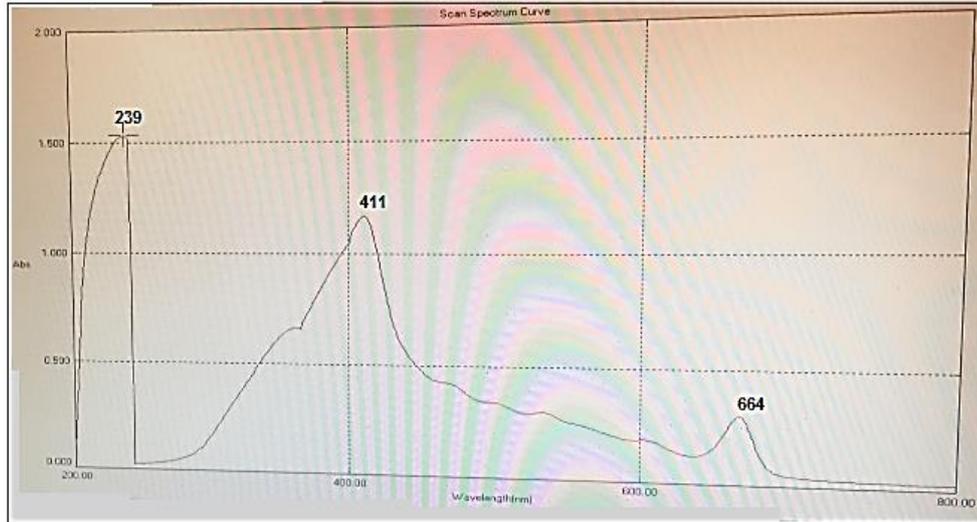
Fuente: Datos experimentales del estudio.

FIGURA N° 14: Espectro UV-Visible de la FR2.



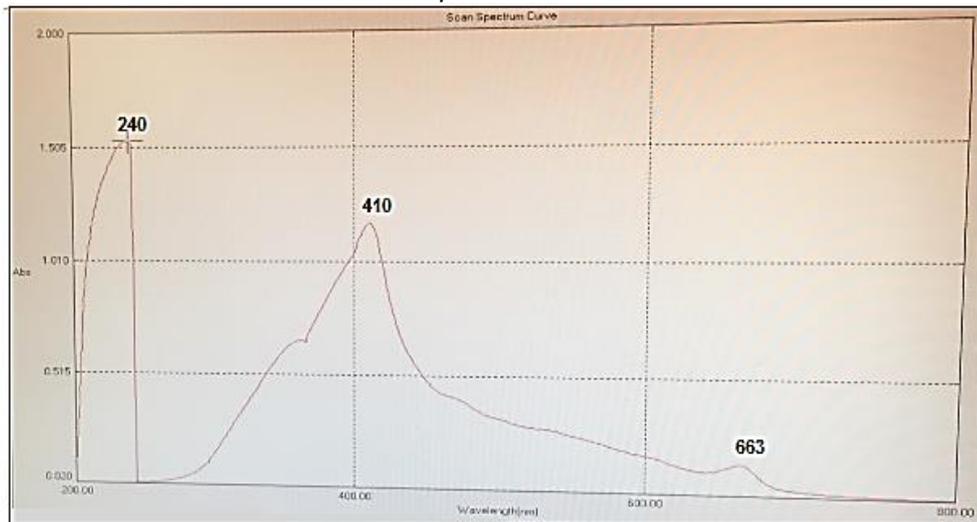
Fuente: Datos experimentales del estudio.

FIGURA N° 15: Espectro UV-Visible de la FR3.



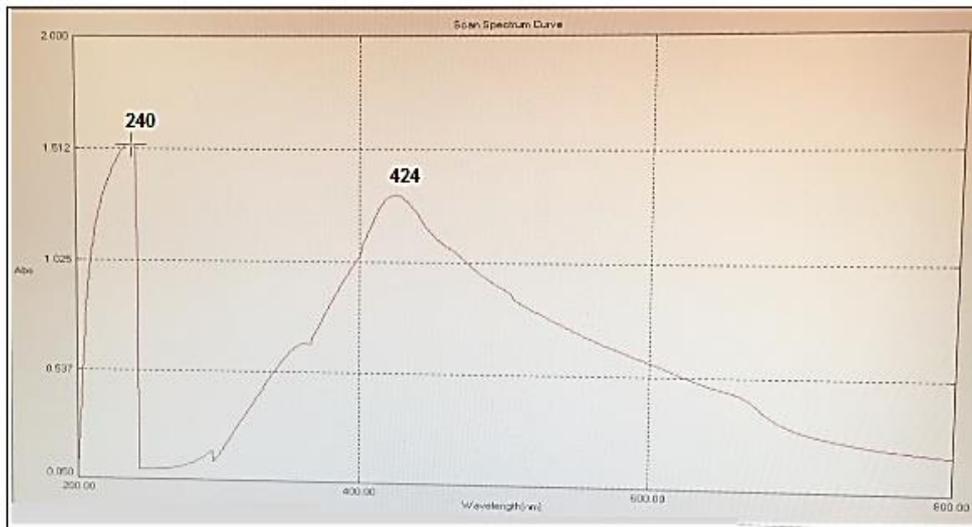
Fuente: Datos experimentales del estudio.

FIGURA N° 16: Espectro UV-Visible de la FR4.



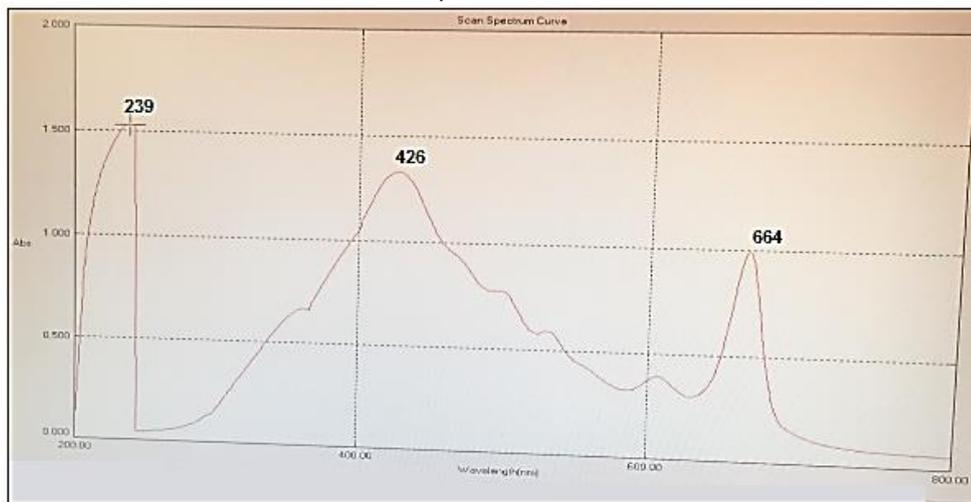
Fuente: Datos experimentales del estudio.

FIGURA N° 17: Espectro UV-Visible de la FR5.



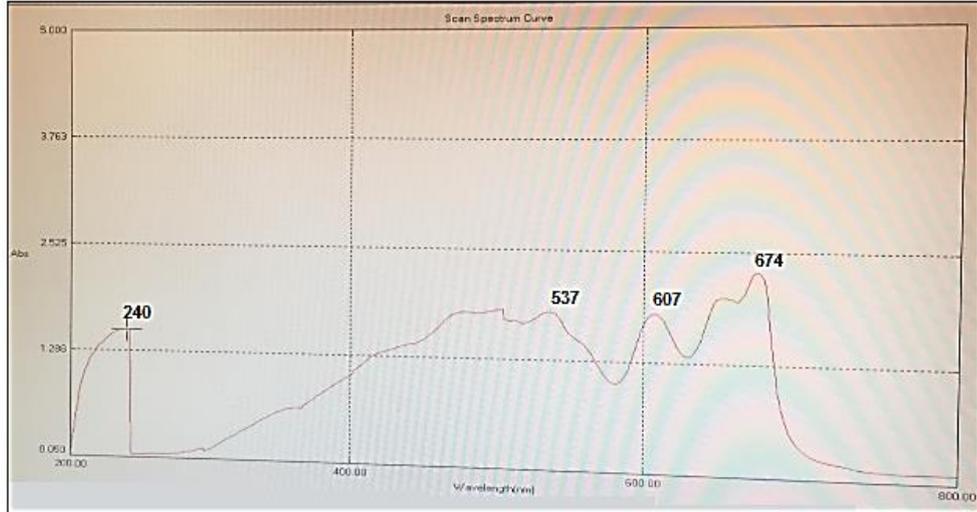
Fuente: Datos experimentales del estudio.

FIGURA N° 18: Espectro UV-Visible de la FR6.



Fuente: Datos experimentales del estudio.

FIGURA N° 19: Espectro UV-Visible de la FR7.



Fuente: Datos experimentales del estudio.

TABLA N° 16: TIPO DE FLAVONOIDES IDENTIFICADOS POR ESPECTROSCOPIA UV/VIS PRESENTES EN *Viola tricolor* L. “pensamiento”

Fracción flavonoídica	Máximos de absorción (nm)	Tipo de flavonoide
FR1	242, 402	Flavona o flavonol
FR2	239, 420	Flavona o flavonol
FR3	239, 411, 664	Flavona o flavonol
FR4	240, 410, 663	Flavona o flavonol
FR5	240, 424	Flavona o flavonol
FR6	239, 426, 664	Flavona o flavonol
FR7	240, 537, 607, 674	Auronas, chalconas o antocianina

Fuente: Datos experimentales del estudio.

TABLA N° 17: REACCIÓN DE SHINODA EN LAS DIFERENTES FRACCIONES OBTENIDAS POR CC DE *Viola tricolor* L. “pensamiento”

Fracción flavonoídica	Reacción de Shinoda	Observación
FR1	Positivo	Color rojo magenta
FR2	Positivo	Color rojo magenta
FR3	Positivo	Color rojo magenta
FR4	Positivo	Color rojo magenta
FR5	Positivo	Color rojo
FR6	Positivo	Color rojo
FR7	Positivo	Color amarillo

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 16, se muestran las siete fracciones (FR1 – FR7) separadas por CC utilizando una resina de Diaion® HP-20 a partir del extracto flavonoídico de *Viola tricolor* L., analizadas por espectroscopía UV-Vis.

Según Andersen and Kenneth, 2006, un excelente método para la obtención de fracciones ricas en flavonoides en CC es la utilización de resinas como DIAION HP-20, con gradientes de elución de metanol – agua. (54) Además la tabla N° 17 muestra que las fracciones obtenidas en CC son ricas en flavonoides.

Según Paredes, 1976, las flavanonas presentan máximos entre 270 – 290 (banda II) y entre 300 – 330 nm (banda I) de menor intensidad, las isoflavonas, tienen máximos entre 250 – 270 nm (banda II) y un máximo de menor intensidad a los 330 nm (banda I), las auronas, se caracterizan por presentar tres o cuatro máximos, teniendo su principal absorción entre 350 – 430 nm, las chalconas, presentan una banda de baja intensidad entre 220 – 270 nm y absorben fuertemente entre 300 – 340 nm, las antocianinas producen una banda entre 500 – 550 nm además de otras de menor intensidad entre 430 – 440 nm y 270 – 280 nm, en el caso de las flavonas, presentan máximos entre 304 – 350 nm (banda I) y 240 – 270 nm (banda II), y los flavonoles, presentan máximos entre 340 – 390 (banda I) y 240 – 270 nm (banda II). (113) Harborne and Baxter, 1999, considera que las flavonas se observa una banda entre 304 – 350 nm y otra entre 239 – 281 nm y que también los flavonoles pueden presentar máximos en 239 nm. (114) Los espectros UV de flavonas y flavonoles en metanol exhiben dos picos de absorción principales en la región 240 – 400 nm. (115)

En las fracciones (FR1 – FR7) se puede observar máximos de absorción de 239, 240, 242 nm que podrían ser flavonoides tipo flavona (banda II) o flavonoides tipo flavonol (banda II), aunque existía la posibilidad de que estos compuestos sean de tipo aurona o chalcona, pero según Lock, 1997, ambos presentan en la banda II absorciones de baja intensidad, caso contrario pasa con nuestro estudio que presentan absorciones de alta intensidad a excepción de la FR7 que si presenta baja intensidad por lo que si se podría

tratar de flavonoide tipo aurona o chalcona, con respecto al máximo de absorción de 537 nm, podría tratarse de flavonoide tipo antocianina.

Además Vukics et al., 2008, encontraron dieciséis glucósidos de flavonoides en extracto metanólico de *Viola tricolor* L. Caracterizaron cuatro O-glucósidos de flavonol, nueve C-glucósidos de flavona, y tres C, O-glucósidos de flavona; de los cuales, los dos constituyentes principales fueron aislados e identificados como violantina (6-C-glucósido-8-C-ramnosil-apigenina) y rutina (3-O-ramnoglucosil quercetina). Además encontraron que todos estos glicoconjugados son derivados de seis agliconas: apigenina, crisoeriol, isorhamnetina, kaempferol, luteolina y quercetina. (116) Según Bravo y Acuña, 2015, los glicósidos son solubles en agua y alcohol. (117) Esto podría indicar que los flavonoides aislados presentarían en su estructura glicósidos, lo que se confirma con la prueba de solubilidad y el Análisis Fitoquímico Cualitativo en la tabla N° 14 y N° 15, respectivamente.

Andersen and Kenneth, 2006, afirman que los compuestos polifenólicos revelan dos bandas de absorción UV características con máximos en el rango de 240 a 285 y de 300 a 550 nm. Las diversas clases de flavonoides se pueden reconocer por sus espectros UV. (54) Finalmente, se demuestra que los máximos de absorción son característicos de compuestos fenólicos en general, especialmente flavonoides; además de observarse máximos correspondientes a pigmentos, responsables de la coloración, que son compuestos coloreados porque absorben la luz en la región visible del espectro que está entre 400 y 800 nm, según Mulder-Krieger y Verpoorte. (118) Uno de los pigmentos carotenoide es la violoxanthina, identificado anteriormente en *V. tricolor* L., soluble en etanol, metanol y éter; cuyo máximo de absorción es 418, 443 y 472 nm en etanol como solvente. (119)

4.6.DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA EN EL EXTRACTO ETANÓLICO

TABLA N° 18: ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS DEL TIEMPO DE INMOVILIDAD, SWIMMING Y CLIMBING DE RATONES TRATADOS A DIFERENTES DOSIS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Viola tricolor* L. SOMETIDOS A LA FST MODIFICADO

DESCRIPTIVOS						
Parámetro	Tratamiento	N	Mínimo	Máximo	Media (seg)	Desviación estándar
Tiempo de inmovilidad	<i>V. tricolor</i> L. 250mg/kg	5	0	65	31.00 ^a	26.077
	<i>V. tricolor</i> L. 500mg/kg	5	0	80	28.00 ^a	30.943
	<i>V. tricolor</i> L. 750mg/kg	5	0	20	14.00 ^a	8.944
	Fluoxetina 20mg/kg	5	15	100	68.00 ^b	35.461
	Solución Salina 0.2ml/20g	5	160	175	168.00 ^c	5.701
Tiempo de swimming	<i>V. tricolor</i> L. 250mg/kg	5	170	225	200.00 ^{bc}	21.213
	<i>V. tricolor</i> L. 500mg/kg	5	205	275	235.00 ^c	26.458
	<i>V. tricolor</i> L. 750mg/kg	5	155	290	231.00 ^c	60.457
	Fluoxetina 20mg/kg	5	130	210	170.00 ^b	29.791
	Solución Salina 0.2ml/20g	5	115	130	123.00 ^a	5.701
Tiempo de climbing	<i>V. tricolor</i> L. 250mg/kg	5	35	105	69.00 ^b	25.100
	<i>V. tricolor</i> L. 500mg/kg	5	10	75	37.00 ^{ab}	26.125
	<i>V. tricolor</i> L. 750mg/kg	5	10	100	35.00 ^{ab}	37.417
	Fluoxetina 20mg/kg	5	20	115	62.00 ^b	47.249
	Solución Salina 0.2ml/20g	5	5	15	9.00 ^a	4.183

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

^a: Primer subconjunto

^b: Segundo subconjunto

^c: Tercer subconjunto

En la tabla N° 18 se aprecia los estadísticos descriptivos de la inmovilidad, swimming y climbing como el mínimo, el máximo, la media y la desviación estándar para cada uno de los grupos presentados en el extracto etanólico.

TABLA N° 19: PRUEBA DE NORMALIDAD DE LOS RESULTADOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO

Prueba de normalidad				
Parámetro	Tratamiento	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Tiempo de inmovilidad	<i>V. tricolor</i> L. 250mg/kg	0.935	5	0.634
	<i>V. tricolor</i> L. 500mg/kg	0.842	5	0.171
	<i>V. tricolor</i> L. 750mg/kg	0.771	5	0.056
	Fluoxetina 20mg/kg	0.902	5	0.421
	Solución Salina 0.2ml/20g	0.961	5	0.814
Tiempo de swimming	<i>V. tricolor</i> L. 250mg/kg	0.951	5	0.747
	<i>V. tricolor</i> L. 500mg/kg	0.942	5	0.679
	<i>V. tricolor</i> L. 750mg/kg	0.887	5	0.341
	Fluoxetina 20mg/kg	0.987	5	0.970
	Solución Salina 0.2ml/20g	0.961	5	0.814
Tiempo de climbing	<i>V. tricolor</i> L. 250mg/kg	0.950	5	0.740
	<i>V. tricolor</i> L. 500mg/kg	0.932	5	0.610
	<i>V. tricolor</i> L. 750mg/kg	0.746	5	0.057
	Fluoxetina 20mg/kg	0.806	5	0.091
	Solución Salina 0.2ml/20g	0.881	5	0.314

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

En la tabla N° 19 se presenta la prueba de Shapiro-Wilk para cada uno de los grupos presentados en el extracto etanólico, en el cual los valores Sig > 0.05, entonces se acepta la hipótesis nula y se concluye que los datos tienen una distribución normal por lo tanto se puede utilizar ANOVA.

TABLA N° 20: ANOVA DE LOS RESULTADOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO

ANOVA						
Parámetro	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Tiempo de inmovilidad	Entre grupos	78464.000	4	19616.000	32.612	0.000
	Dentro de grupos	12030.000	20	601.500		
	Total	90494.000	24			
Tiempo de swimming	Entre grupos	43394.000	4	10848.500	9.475	0.000
	Dentro de grupos	22900.000	20	1145.000		
	Total	66294.000	24			
Tiempo de climbing	Entre grupos	11456.000	4	2864.000	2.886	0.049
	Dentro de grupos	19850.000	20	992.500		
	Total	31306.000	24			

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

En la tabla N° 20 se muestra el análisis por ANOVA unifactorial. Como el valor de Sig = 0.000 es mucho menor que 0.05 se afirma que existe diferencia altamente significativa en la inmovilidad y swimming media presentada a partir de los diferentes tratamientos, es decir que existe actividad antidepresiva.

Como el valor de Sig = 0.049 es menor que 0.05 se afirma que existe diferencia significativa en el climbing media presentada a partir de los diferentes tratamientos.

TABLA N° 21: PRUEBA DE DUNCAN DE LOS RESULTADOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO

SUBCONJUNTOS HOMOGÉNEOS: DUNCAN					
Parámetro	Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
Tiempo de inmovilidad	<i>V. tricolor</i> L. 750mg/kg	5	14.00		
	<i>V. tricolor</i> L. 500mg/kg	5	28.00		
	<i>V. tricolor</i> L. 250mg/kg	5	31.00		
	Fluoxetina 20mg/kg	5		68.00	
	Solución Salina 0.2ml/20g	5			168.00
	Sig.		0.313	1.000	1.000
Tiempo de swimming	Solución Salina 0.2ml/20g	5	123.00		
	Fluoxetina 20mg/kg	5		170.00	
	<i>V. tricolor</i> L. 250mg/kg	5		200.00	200.00
	<i>V. tricolor</i> L. 750mg/kg	5			231.00
	<i>V. tricolor</i> L. 500mg/kg	5			235.00
	Sig.		1.000	0.176	0.137
Tiempo de climbing	Solución Salina 0.2ml/20g	5	9.00		
	<i>V. tricolor</i> L. 750mg/kg	5	35.00	35.00	
	<i>V. tricolor</i> L. 500mg/kg	5	37.00	37.00	
	Fluoxetina 20mg/kg	5		62.00	
	<i>V. tricolor</i> L. 250mg/kg	5		69.00	
	Sig.		0.198	0.132	

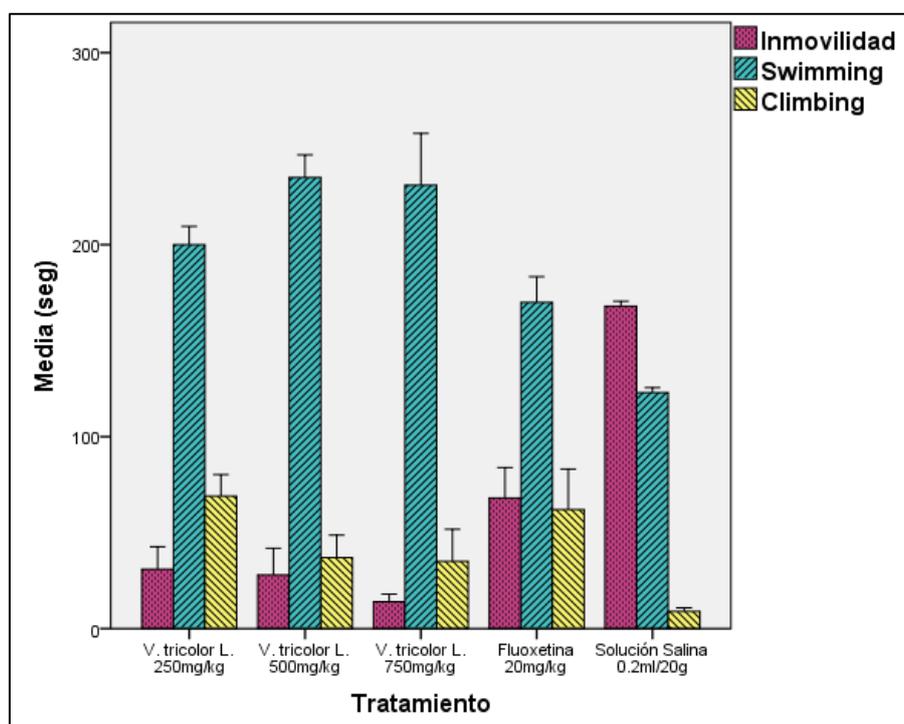
Fuente: Datos estadísticos del estudio.

En la tabla N° 21 se observa que en el tiempo de inmovilidad, se consideraron subconjuntos, en el primer subconjunto se encuentran los tratamientos del extracto etanólico de *V. tricolor* L. a las dosis de 750, 500 y 250 mg/kg de peso que redujeron el tiempo de inmovilidad en los roedores en 14 ± 8.944 , 28 ± 30.943 y 31 ± 26.077 segundos respectivamente, en el segundo subconjunto se encuentra el tratamiento con el patrón fluoxetina y el tercer subconjunto se encuentra el tratamiento con el control (solución salina), entonces los tratamientos del primer subconjunto presentan mayor actividad antidepresiva que el grupo patrón, estadísticamente.

El tiempo de swimming fue mayor para el tratamiento del extracto etanólico de *V. tricolor* L. a la dosis de 500 y 750 mg/kg de peso que aumentaron el tiempo de swimming en los roedores en 235 ± 26.458 y 231 ± 60.457 segundos respectivamente.

El tiempo de climbing fue mayor para el tratamiento del extracto etanólico de *V. tricolor* L. a la dosis de 250 mg/kg de peso y Fluoxetina 20 mg/kg de peso que aumentaron el tiempo de climbing en los roedores en 69 ± 25.100 y 62 ± 47.249 segundos respectivamente.

GRÁFICO N° 1: TIEMPO DE INMOVILIDAD, SWIMMING Y CLIMBING DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Viola tricolor* L. SOMETIDOS A LA FST MODIFICADO



Fuente: Datos estadísticos del estudio.

En resumen, el gráfico N° 1 muestra el tiempo de cada parámetro a los diferentes tratamientos sometidos, en donde se muestra que los extractos etanólicos de *V. tricolor* L. disminuye el tiempo de inmovilidad pero también existe un incremento del tiempo de swimming en comparación a la fluoxetina y al grupo control en la FST modificado.

4.7.DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA EN EL EXTRACTO FLAVONOÍDICO

TABLA N° 22: ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS DEL TIEMPO DE INMOVILIDAD, SWIMMING Y CLIMBING DE RATONES TRATADOS A DIFERENTES DOSIS DEL EXTRACTO FLAVONOÍDICO DE *Viola tricolor* L. SOMETIDOS A LA FST MODIFICADO

DESCRIPTIVOS						
Parámetro	Tratamiento	N	Mínimo	Máximo	Media (seg)	Desviación estándar
Tiempo de inmovilidad	<i>V. tricolor</i> L. 250mg/kg	5	20	65	46.00 ^{ab}	19.812
	<i>V. tricolor</i> L. 500mg/kg	5	10	45	24.00 ^a	12.942
	<i>V. tricolor</i> L. 750mg/kg	5	10	60	25.00 ^a	20.310
	Fluoxetina 20mg/kg	5	15	100	68.00 ^b	35.461
	Solución Salina 0.2ml/20g	5	160	175	168.00 ^c	5.701
Tiempo de swimming	<i>V. tricolor</i> L. 250mg/kg	5	210	240	224.00 ^c	13.874
	<i>V. tricolor</i> L. 500mg/kg	5	240	270	259.00 ^d	12.450
	<i>V. tricolor</i> L. 750mg/kg	5	240	280	258.00 ^d	18.235
	Fluoxetina 20mg/kg	5	130	210	170.00 ^b	29.791
	Solución Salina 0.2ml/20g	5	115	130	123.00 ^a	5.701
Tiempo de climbing	<i>V. tricolor</i> L. 250mg/kg	5	0	70	30.00	30.208
	<i>V. tricolor</i> L. 500mg/kg	5	0	50	17.00	19.235
	<i>V. tricolor</i> L. 750mg/kg	5	0	40	17.00	19.235
	Fluoxetina 20mg/kg	5	20	115	62.00	47.249
	Solución Salina 0.2ml/20g	5	5	15	9.00	4.183

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

- ^a: Primer subconjunto
- ^b: Segundo subconjunto
- ^c: Tercer subconjunto
- ^d: Cuarto subconjunto

En la tabla N° 22 se aprecia los estadísticos descriptivos de la inmovilidad, swimming y climbing como el mínimo, el máximo, la media y la desviación estándar para cada uno de los grupos presentados en el extracto flavonoídico.

TABLA N° 23: PRUEBA DE NORMALIDAD DE LOS RESULTADOS DEL EXTRACTO FLAVONOÍDICO

Prueba de normalidad				
Parámetro	Tratamiento	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Tiempo de inmovilidad	<i>V. tricolor</i> L. 250mg/kg	0.879	5	0.305
	<i>V. tricolor</i> L. 500mg/kg	0.894	5	0.376
	<i>V. tricolor</i> L. 750mg/kg	0.770	5	0.055
	Fluoxetina 20mg/kg	0.902	5	0.421
	Solución Salina 0.2ml/20g	0.961	5	0.814
Tiempo de swimming	<i>V. tricolor</i> L. 250mg/kg	0.876	5	0.292
	<i>V. tricolor</i> L. 500mg/kg	0.895	5	0.384
	<i>V. tricolor</i> L. 750mg/kg	0.860	5	0.229
	Fluoxetina 20mg/kg	0.987	5	0.970
	Solución Salina 0.2ml/20g	0.961	5	0.814
Tiempo de climbing	<i>V. tricolor</i> L. 250mg/kg	0.902	5	0.422
	<i>V. tricolor</i> L. 500mg/kg	0.801	5	0.083
	<i>V. tricolor</i> L. 750mg/kg	0.829	5	0.137
	Fluoxetina 20mg/kg	0.806	5	0.091
	Solución Salina 0.2ml/20g	0.881	5	0.314

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

En la tabla N° 23 se presenta la prueba de Shapiro-Wilk para cada uno de los grupos presentados en el extracto flavonoídico, en el cual los valores Sig > 0.05, entonces se acepta la hipótesis nula y se concluye que los datos tienen una distribución normal por lo tanto se puede utilizar ANOVA.

TABLA N° 24: ANOVA DE LOS RESULTADOS DEL EXTRACTO FLAVONOÍDICO

ANOVA						
Parámetro	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Tiempo de inmovilidad	Entre grupos	71264.000	4	17816.000	39.372	0.000
	Dentro de grupos	9050.000	20	452.500		
	Total	80314.000	24			
Tiempo de swimming	Entre grupos	70094.000	4	17523.500	54.761	0.000
	Dentro de grupos	6400.000	20	320.000		
	Total	76494.000	24			
Tiempo de climbing	Entre grupos	8790.000	4	2197.500	2.816	0.053
	Dentro de grupos	15610.000	20	780.500		
	Total	24400.000	24			

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

En la tabla N° 24 se muestra el análisis por ANOVA unifactorial. Como el valor de Sig = 0.000 es mucho menor que 0.05 se afirma que existe diferencia altamente significativa en la inmovilidad y swimming media presentada a partir de los diferentes tratamientos, es decir que existe actividad antidepresiva.

En el caso del tiempo de climbing, como el valor de Sig = 0.053 es mayor que 0.05 se afirma que no existe diferencia significativa en el climbing media presentada a partir de los diferentes tratamientos del extracto flavonoídico de *V. tricolor* L.

TABLA N° 25: PRUEBA DE DUNCAN DE LOS RESULTADOS DEL EXTRACTO FLAVONOÍDICO

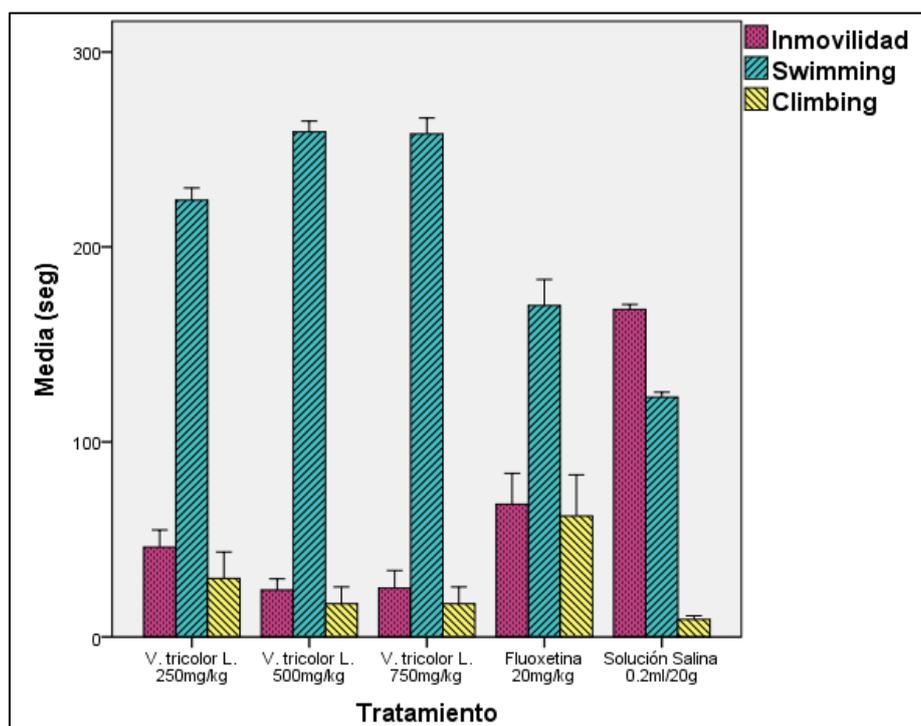
SUBCONJUNTOS HOMOGÉNEOS: DUNCAN						
Parámetro	Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4
Tiempo de inmovilidad	<i>V. tricolor</i> L. 500mg/kg	5	24.00			
	<i>V. tricolor</i> L. 750mg/kg	5	25.00			
	<i>V. tricolor</i> L. 250mg/kg	5	46.00	46.00		
	Fluoxetina 20mg/kg	5		68.00		
	Solución Salina 0.2ml/20g	5			168.00	
	Sig.		0.137	0.118	1.000	
Tiempo de swimming	Solución Salina 0.2ml/20g	5	123.00			
	Fluoxetina 20mg/kg	5		170.00		
	<i>V. tricolor</i> L. 250mg/kg	5			224.00	
	<i>V. tricolor</i> L. 750mg/kg	5				258.00
	<i>V. tricolor</i> L. 500mg/kg	5				259.00
	Sig.		1.000	1.000	1.000	0.930

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

En la tabla N° 25 se observa que en el tiempo de inmovilidad, se consideraron subconjuntos, en el primer subconjunto se encuentran los tratamientos del extracto flavonoídico de *V. tricolor* L. a las dosis de 500 y 750 mg/kg de peso que redujeron el tiempo de inmovilidad en los roedores en 24 ± 12.942 y 25 ± 20.310 segundos respectivamente, en el segundo subconjunto se encuentra el tratamiento del extracto flavonoídico de *V. tricolor* L. a la dosis de 250 mg/kg de peso compartiendo datos con el subconjunto 1, además en este subconjunto se encuentra el tratamiento con el patrón fluoxetina y el tercer subconjunto se encuentra el tratamiento con el control (solución salina), entonces los tratamientos del primer subconjunto (500 y 750 mg/kg) presentan mayor actividad antidepresiva que el grupo patrón, estadísticamente.

El tiempo de swimming fue mayor para el tratamiento del extracto flavonoídico de *V. tricolor* L. a la dosis de 500 y 750 mg/kg de peso que aumentaron el tiempo de swimming en los roedores en 259 ± 12.450 y 258 ± 18.235 segundos respectivamente.

GRÁFICO N° 2: TIEMPO DE INMOVILIDAD, SWIMMING Y CLIMBING DEL EXTRACTO FLAVONOÍDICO DE *Viola tricolor* L. SOMETIDOS A LA FST MODIFICADO



Fuente: Datos estadísticos del estudio.

En resumen, el gráfico N° 2 muestra el tiempo de cada parámetro a los diferentes tratamientos sometidos, en donde se muestra que los extractos flavonoídicos de *V. tricolor* L. disminuye el tiempo de inmovilidad pero también existe un incremento del tiempo de swimming en comparación a la fluoxetina y al grupo control en la FST modificado.

4.8.DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA EN LA FR2

TABLA N° 26: ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS DEL TIEMPO DE INMOVILIDAD, SWIMMING Y CLIMBING DE RATONES TRATADOS A DIFERENTES DOSIS DE LA FR2 DE *Viola tricolor* L. SOMETIDOS A LA FST MODIFICADO

DESCRIPTIVOS						
Parámetro	Tratamiento	N	Mínimo	Máximo	Media (seg)	Desviación estándar
Tiempo de inmovilidad	<i>V. tricolor</i> L. 90mg/kg	5	0	80	30.00 ^{ab}	32.596
	<i>V. tricolor</i> L. 180mg/kg	5	10	90	35.00 ^{ab}	32.210
	<i>V. tricolor</i> L. 360mg/kg	5	0	50	27.00 ^a	23.076
	Fluoxetina 20mg/kg	5	15	100	68.00 ^b	35.461
	Solución Salina 0.2ml/20g	5	160	175	168.00 ^c	5.701
Tiempo de swimming	<i>V. tricolor</i> L. 90mg/kg	5	160	230	199.00 ^{bc}	33.615
	<i>V. tricolor</i> L. 180mg/kg	5	180	260	221.00 ^c	35.071
	<i>V. tricolor</i> L. 360mg/kg	5	180	290	241.00 ^c	42.485
	Fluoxetina 20mg/kg	5	130	210	170.00 ^b	29.791
	Solución Salina 0.2ml/20g	5	115	130	123.00 ^a	5.701
Tiempo de climbing	<i>V. tricolor</i> L. 90mg/kg	5	0	120	71.00	44.777
	<i>V. tricolor</i> L. 180mg/kg	5	10	105	44.00	45.194
	<i>V. tricolor</i> L. 360mg/kg	5	5	75	32.00	25.884
	Fluoxetina 20mg/kg	5	20	115	62.00	47.249
	Solución Salina 0.2ml/20g	5	5	15	9.00	4.183

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

- ^a : Primer subconjunto
- ^b : Segundo subconjunto
- ^c : Tercer subconjunto

En la tabla N° 26 se aprecia los estadísticos descriptivos de la inmovilidad, swimming y climbing como el mínimo, el máximo, la media y la desviación estándar para cada uno de los grupos presentados en la FR2.

TABLA N° 27: PRUEBA DE NORMALIDAD DE LOS RESULTADOS DE LA FR2

Prueba de normalidad				
Parámetro	Tratamiento	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Tiempo de inmovilidad	<i>V. tricolor</i> L. 90mg/kg	0.893	5	0.374
	<i>V. tricolor</i> L. 180mg/kg	0.811	5	0.099
	<i>V. tricolor</i> L. 360mg/kg	0.863	5	0.241
	Fluoxetina 20mg/kg	0.902	5	0.421
	Solución Salina 0.2ml/20g	0.961	5	0.814
Tiempo de swimming	<i>V. tricolor</i> L. 90mg/kg	0.791	5	0.068
	<i>V. tricolor</i> L. 180mg/kg	0.897	5	0.396
	<i>V. tricolor</i> L. 360mg/kg	0.977	5	0.916
	Fluoxetina 20mg/kg	0.987	5	0.970
	Solución Salina 0.2ml/20g	0.961	5	0.814
Tiempo de climbing	<i>V. tricolor</i> L. 90mg/kg	0.918	5	0.515
	<i>V. tricolor</i> L. 180mg/kg	0.784	5	0.060
	<i>V. tricolor</i> L. 360mg/kg	0.850	5	0.195
	Fluoxetina 20mg/kg	0.806	5	0.091
	Solución Salina 0.2ml/20g	0.881	5	0.314

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

En la tabla N° 27 se presenta la prueba de Shapiro-Wilk para cada uno de los grupos presentados en la fracción FR2, en el cual los valores Sig > 0.05, entonces se acepta la hipótesis nula y se concluye que los datos tienen una distribución normal por lo tanto se puede utilizar ANOVA.

TABLA N° 28: ANOVA DE LOS RESULTADOS DE LA FR2

ANOVA						
Parámetro	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Tiempo de inmovilidad	Entre grupos	70926.000	4	17731.500	22.602	0.000
	Dentro de grupos	15690.000	20	784.500		
	Total	86616.000	24			
Tiempo de swimming	Entre grupos	42644.000	4	10661.000	10.483	0.000
	Dentro de grupos	20340.000	20	1017.000		
	Total	62984.000	24			
Tiempo de climbing	Entre grupos	12106.000	4	3026.500	2.172	0.109
	Dentro de grupos	27870.000	20	1393.500		
	Total	39976.000	24			

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

En la tabla N° 28 se muestra el análisis por ANOVA unifactorial. Como el valor de Sig = 0.000 es mucho menor que 0.05 se afirma que existe diferencia

altamente significativa en la inmovilidad y el swimming media presentada a partir de los diferentes tratamientos, es decir que existe actividad antidepressiva.

En el caso del tiempo de climbing, como el valor de Sig = 0.109 es mayor que 0.05 se afirma que no existe diferencia significativa en el climbing media presentada a partir de los diferentes tratamientos de la FR2 de *V. tricolor* L.

TABLA N° 29: PRUEBA DE DUNCAN DE LOS RESULTADOS DE LA FR2

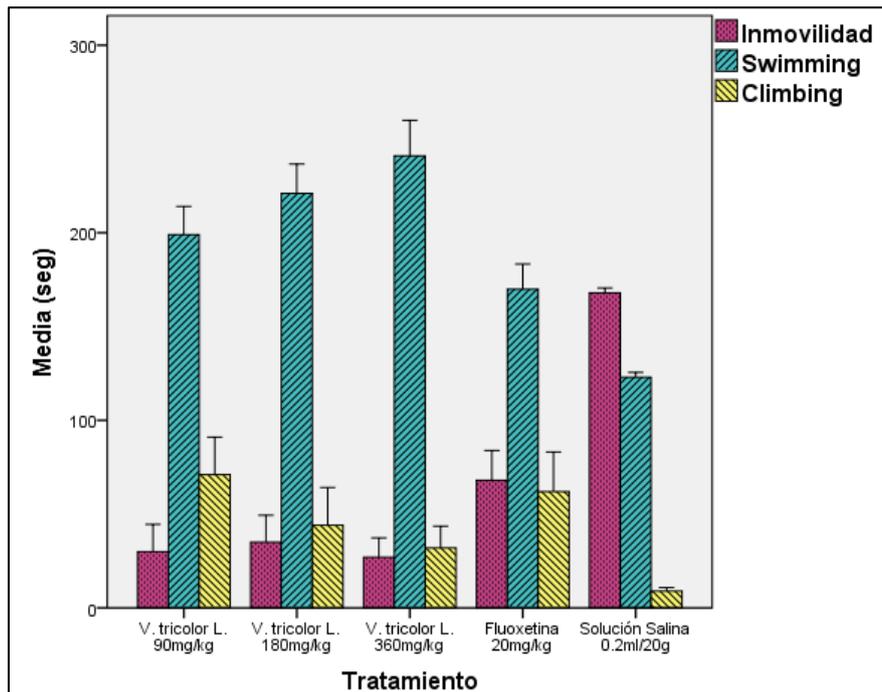
SUBCONJUNTOS HOMOGÉNEOS: DUNCAN					
Parámetro	Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
Tiempo de inmovilidad	<i>V. tricolor</i> L. 360mg/kg	5	27.00		
	<i>V. tricolor</i> L. 90mg/kg	5	30.00	30.00	
	<i>V. tricolor</i> L. 180mg/kg	5	35.00	35.00	
	Fluoxetina 20mg/kg	5		68.00	
	Solución Salina 0.2ml/20g	5			168.00
	Sig.		0.675	0.054	1.000
Tiempo de swimming	Solución Salina 0.2ml/20g	5	123.00		
	Fluoxetina 20mg/kg	5		170.00	
	<i>V. tricolor</i> L. 90mg/kg	5		199.00	199.00
	<i>V. tricolor</i> L. 180mg/kg	5			221.00
	<i>V. tricolor</i> L. 360mg/kg	5			241.00
	Sig.		1.000	0.166	0.061

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

En la tabla N° 29 se observa que en el tiempo de inmovilidad, se consideraron subconjuntos, en el primer subconjunto se encuentran los tratamientos de la FR2 de *V. tricolor* L. a la dosis de 360 mg/kg de peso que redujo el tiempo de inmovilidad en los roedores en 27 ± 23.076 segundos, en el segundo subconjunto se encuentra el tratamiento de la FR2 de *V. tricolor* L. a las dosis de 90 y 180 mg/kg de peso compartiendo datos con el subconjunto 1, además en este subconjunto se encuentra el tratamiento con el patrón fluoxetina y el tercer subconjunto se encuentra el tratamiento con el control (solución salina), entonces el tratamiento del primer subconjunto (360 mg/kg) presenta mayor actividad antidepressiva que el grupo patrón.

El tiempo de swimming fue mayor para el tratamiento de la FR2 de *V. tricolor* L. a las dosis de 360 y 180 mg/kg de peso que aumentaron el tiempo de swimming en los roedores en 241 ± 42.485 y 221 ± 35.071 segundos respectivamente.

GRÁFICO N° 3: TIEMPO DE INMOVILIDAD, SWIMMING Y CLIMBING DE LA FR2 DE *Viola tricolor* L. SOMETIDOS A LA FST MODIFICADO



Fuente: Datos estadísticos del estudio.

En resumen, el gráfico N° 3 muestra el tiempo de cada parámetro a los diferentes tratamientos sometidos, en donde se muestra que la FR2 de *V. tricolor* L. disminuye el tiempo de inmovilidad pero también existe un incremento del tiempo de swimming en comparación a la fluoxetina y al grupo control en la FST modificado.

4.9.DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA EN LA FR3

TABLA N° 30: ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS DEL TIEMPO DE INMOVILIDAD, SWIMMING Y CLIMBING DE RATONES TRATADOS A DIFERENTES DOSIS DE LA FR3 DE *Viola tricolor* L. SOMETIDOS A LA FST MODIFICADO

DESCRIPTIVOS						
Parámetro	Tratamiento	N	Mínimo	Máximo	Media (seg)	Desviación estándar
Tiempo de inmovilidad	<i>V. tricolor</i> L. 90mg/kg	5	0	35	16.00 ^a	16.355
	<i>V. tricolor</i> L. 180mg/kg	5	5	115	57.00 ^b	44.805
	<i>V. tricolor</i> L. 360mg/kg	5	5	15	8.00 ^a	4.472
	Fluoxetina 20mg/kg	5	15	100	68.00 ^b	35.461
	Solución Salina 0.2ml/20g	5	160	175	168.00 ^c	5.701
Tiempo de swimming	<i>V. tricolor</i> L. 90mg/kg	5	200	270	229.00 ^c	29.026
	<i>V. tricolor</i> L. 180mg/kg	5	185	285	234.00 ^c	43.932
	<i>V. tricolor</i> L. 360mg/kg	5	230	280	256.00 ^c	22.749
	Fluoxetina 20mg/kg	5	130	210	170.00 ^b	29.791
	Solución Salina 0.2ml/20g	5	115	130	123.00 ^a	5.701
Tiempo de climbing	<i>V. tricolor</i> L. 90mg/kg	5	15	100	55.00 ^b	39.843
	<i>V. tricolor</i> L. 180mg/kg	5	0	30	9.00 ^a	12.450
	<i>V. tricolor</i> L. 360mg/kg	5	10	65	36.00 ^{ab}	23.292
	Fluoxetina 20mg/kg	5	20	115	62.00 ^b	47.249
	Solución Salina 0.2ml/20g	5	5	15	9.00 ^a	4.183

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

- ^a : Primer subconjunto
- ^b : Segundo subconjunto
- ^c : Tercer subconjunto

En la tabla N° 30 se aprecia los estadísticos descriptivos de la inmovilidad, swimming y climbing como el mínimo, el máximo, la media y la desviación estándar para cada uno de los grupos presentados en la FR3.

TABLA N° 31: PRUEBA DE NORMALIDAD DE LOS RESULTADOS DE LA FR3

Prueba de normalidad				
Parámetro	Tratamiento	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Tiempo de inmovilidad	<i>V. tricolor</i> L. 90mg/kg	0.870	5	0.265
	<i>V. tricolor</i> L. 180mg/kg	0.955	5	0.776
	<i>V. tricolor</i> L. 360mg/kg	0.771	5	0.056
	Fluoxetina 20mg/kg	0.902	5	0.421
	Solución Salina 0.2ml/20g	0.961	5	0.814
Tiempo de swimming	<i>V. tricolor</i> L. 90mg/kg	0.937	5	0.642
	<i>V. tricolor</i> L. 180mg/kg	0.900	5	0.410
	<i>V. tricolor</i> L. 360mg/kg	0.839	5	0.163
	Fluoxetina 20mg/kg	0.987	5	0.970
	Solución Salina 0.2ml/20g	0.961	5	0.814
Tiempo de climbing	<i>V. tricolor</i> L. 90mg/kg	0.848	5	0.189
	<i>V. tricolor</i> L. 180mg/kg	0.806	5	0.090
	<i>V. tricolor</i> L. 360mg/kg	0.933	5	0.619
	Fluoxetina 20mg/kg	0.806	5	0.091
	Solución Salina 0.2ml/20g	0.881	5	0.314

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

En la tabla N° 31 se presenta la prueba de Shapiro-Wilk para cada uno de los grupos presentados en la fracción FR3, en el cual los valores Sig > 0.05, entonces se acepta la hipótesis nula y se concluye que los datos tienen una distribución normal por lo tanto se puede utilizar ANOVA.

TABLA N° 32: ANOVA DE LOS RESULTADOS DE LA FR3

ANOVA						
Parámetro	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Tiempo de inmovilidad	Entre grupos	81596.000	4	20399.000	28.450	0.000
	Dentro de grupos	14340.000	20	717.000		
	Total	95936.000	24			
Tiempo de swimming	Entre grupos	59666.000	4	14916.500	17.716	0.000
	Dentro de grupos	16840.000	20	842.000		
	Total	76506.000	24			
Tiempo de climbing	Entre grupos	12394.000	4	3098.500	3.416	0.028
	Dentro de grupos	18140.000	20	907.000		
	Total	30534.000	24			

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

En la tabla N° 32 se muestra el análisis por ANOVA unifactorial. Como el valor de Sig = 0.000 es mucho menor que 0.05 se afirma que existe diferencia

altamente significativa en la inmovilidad y swimming media presentada a partir de los diferentes tratamientos, es decir que existe actividad antidepresiva.

En el caso del tiempo de climbing, como el valor de Sig = 0.028 es menor que 0.05 se afirma que existe diferencia significativa en el climbing media presentada a partir de los diferentes tratamientos.

TABLA N° 33: PRUEBA DE DUNCAN DE LOS RESULTADOS DE LA FR3

SUBCONJUNTOS HOMOGÉNEOS: DUNCAN					
Parámetro	Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
Tiempo de inmovilidad	<i>V. tricolor</i> L. 360mg/kg	5	8.00		
	<i>V. tricolor</i> L. 90mg/kg	5	16.00		
	<i>V. tricolor</i> L. 180mg/kg	5		57.00	
	Fluoxetina 20mg/kg	5		68.00	
	Solución Salina 0.2ml/20g	5			168.00
	Sig.		0.642	0.523	1.000
Tiempo de swimming	Solución Salina 0.2ml/20g	5	123.00		
	Fluoxetina 20mg/kg	5		170.00	
	<i>V. tricolor</i> L. 90mg/kg	5			229.00
	<i>V. tricolor</i> L. 180mg/kg	5			234.00
	<i>V. tricolor</i> L. 360mg/kg	5			256.00
	Sig.		1.000	1.000	0.179
Tiempo de climbing	<i>V. tricolor</i> L. 180mg/kg	5	9.00		
	Solución Salina 0.2ml/20g	5	9.00		
	<i>V. tricolor</i> L. 360mg/kg	5	36.00	36.00	
	<i>V. tricolor</i> L. 90mg/kg	5		55.00	
	Fluoxetina 20mg/kg	5		62.00	
	Sig.		0.194	0.211	

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

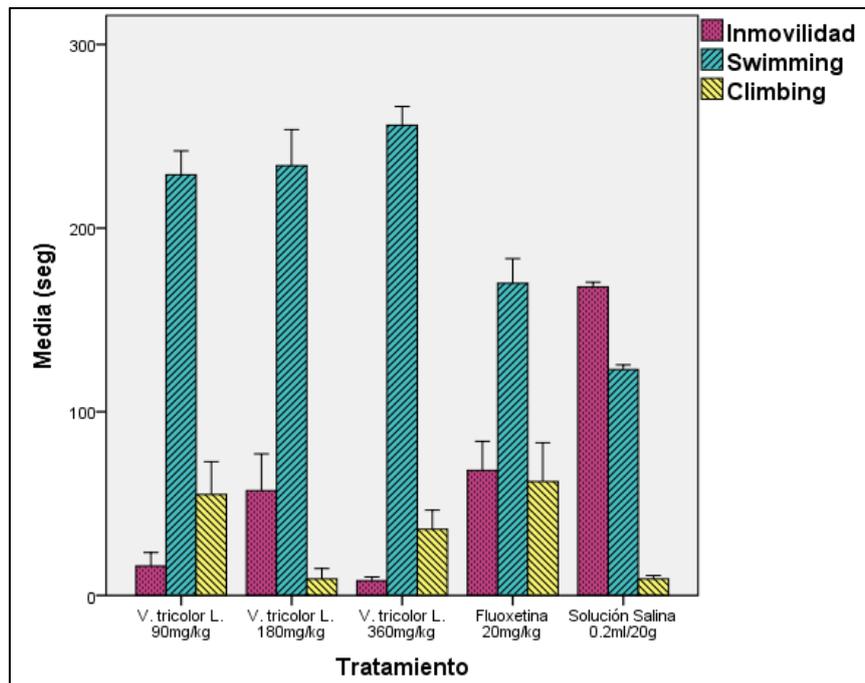
En la tabla N° 33 se observa que en el tiempo de inmovilidad, se consideraron subconjuntos, en el primer subconjunto se encuentran los tratamientos de la FR3 de *V. tricolor* L. a las dosis de 360 y 90 mg/kg de peso que redujeron el tiempo de inmovilidad en los roedores en 8 ± 4.472 y 16 ± 16.355 segundos respectivamente, en el segundo subconjunto se encuentra el tratamiento de la FR3 de *V. tricolor* L. a la dosis de 180 mg/kg de peso y al tratamiento con fluoxetina y el tercer subconjunto se encuentra el tratamiento con el control (solución salina), entonces el tratamiento del primer subconjunto (360 y 90 mg/kg) presentan mayor actividad antidepresiva que el grupo patrón.

El tiempo de swimming fue mayor para el tratamiento de la FR3 de *V. tricolor* L. a las dosis de 360, 180 y 90 mg/kg de peso que aumentaron el tiempo de

swimming en los roedores en 256 ± 22.749 , 234 ± 43.932 y 229 ± 29.026 segundos respectivamente.

El tiempo de climbing fue mayor para el tratamiento con fluoxetina y del tratamiento de la FR3 de *V. tricolor* L. a la dosis de 90 mg/kg de peso que aumentaron el tiempo de climbing en los roedores en 62 ± 47.249 y 55 ± 39.843 segundos respectivamente.

GRÁFICO N° 4: TIEMPO DE INMOVILIDAD, SWIMMING Y CLIMBING DE LA FR3 DE *Viola tricolor* L. SOMETIDOS A LA FST MODIFICADO



Fuente: Datos estadísticos del estudio.

En resumen, el gráfico N° 4 muestra el tiempo de cada parámetro a los diferentes tratamientos sometidos, en donde se muestra que la FR3 de *V. tricolor* L. disminuye el tiempo de inmovilidad pero también existe un incremento del tiempo de swimming en comparación a la fluoxetina y al grupo control en la FST modificado.

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

La prueba de nado forzado (FST), desarrollada originalmente por Porsolt et al., es una prueba de comportamiento en roedores que se utiliza para evaluar la mayoría de los fármacos antidepresivos actualmente disponibles, además de la eficacia antidepresiva de nuevos compuestos y las manipulaciones experimentales que tienen como objetivo generar o prevenir estados depresivos, además, la FST es uno de los modelos más utilizados para evaluar comportamientos similares a los antidepresivos en ratas y ratones. (120) (121)

La prueba de nado forzado es un modelo animal de depresión inducida por desesperación en el que el animal se ve obligado a nadar sin poder salir frente a una situación de estrés inducido, se genera una disminución de la respuesta de escape llamada inmovilidad. (122) (123) La dosis utilizada en la prueba de nado forzado, son dosis altas en comparación con la humana, pero los parámetros farmacocinéticos en ratones son muy diferentes (es decir, la vida media es de aproximadamente 1h para los ratones en comparación con varias horas en humanos). (95)

La FST es una buena herramienta de detección con buena confiabilidad y validez predictiva, a pesar de eso ha sido cuestionada muchas veces. Grillo et al., 2011, Karson et al., 2013, y muchos otros autores han comparado los resultados de la FST con otras pruebas de medición de la depresión, como la prueba de preferencia de sacarosa que se basa en la medición de la anhedonia inducida por estrés en ratones, encontrado resultados consistentes. Otro tema que causa controversia y que ha sido analizado en varios estudios son las modificaciones del procedimiento de la FST desarrollado por Porsolt y su influencia en sus resultados, ya que el comportamiento del animal se analiza generalmente mediante el registro de intervalos parciales. Álvarez-Suárez et al., mostraron que no existen diferencias significativas entre intervalos de 3, 5 y 10 segundos analizados en la FST para las principales conductas registradas (inmovilidad, swimming y climbing). (124) (125)

Lucki et al., modificaron algunos parámetros de la FST tradicional para facilitar la diferenciación entre las clases de fármacos antidepresivos serotoninérgicos y noradrenérgicos. Todos los fármacos antidepresivos reducen la inmovilidad en

la FST, la versión modificada de la FST además de considerar la inmovilidad, considera una clasificación en los comportamientos activos que son: climbing y swimming, con el fin de facilitar la diferenciación entre las clases de fármacos antidepressivos serotoninérgicos y noradrenérgicos respectivamente. (120) (126) (127)

En este estudio los resultados de la FST modificado mostraron que el tiempo de inmovilidad en los ratones tratados con el extracto etanólico de las partes aéreas de *V. tricolor* L. a las dosis de 750, 500 y 250 mg/kg (Tabla N° 18), con el extracto flavonoídico disminuyeron a las dosis de 750 y 500 mg/kg (Tabla N° 22), con la FR2 disminuyeron a una dosis de 360 mg/kg (Tabla N° 26), y con la FR3 disminuyeron a las dosis de 360 y 90 mg/kg (Tabla N° 30); disminuyeron en relación al grupo patrón. Entonces, los extractos de *Viola tricolor* L. disminuyeron notablemente el tiempo de inmovilidad.

En el caso del tiempo de climbing fue significativamente mayor en los ratones tratados con el extracto etanólico de *V. tricolor* L. y la FR3 a la dosis de 250 y 90 mg/kg respectivamente en relación al grupo patrón, y con respecto al extracto flavonoídico y la FR2 no existe diferencia significativa estadísticamente. Por otro lado el tiempo de swimming fue significativamente alto en el grupo de ratones tratados con los extractos etanólico y flavonoídico de *V. tricolor* L. a las dosis de 500 y 750 mg/kg para ambos extractos, con la FR2 fue mayor a las dosis de 360 y 180 mg/kg y con la FR3 fue mayor a las dosis de 360, 180 y 90 mg/kg; todos los extractos en relación al grupo patrón. Entonces, los extractos de *Viola tricolor* L. aumentaron notablemente el tiempo de swimming con respecto al tiempo de climbing.

Los medicamentos que afectan a la neurotransmisión serotoninérgica, por ejemplo, fluoxetina, sertralina, paroxetina, citalopram; aumentan el tiempo de "swimming", mientras que los medicamentos que afectan la neurotransmisión noradrenérgica por ejemplo, imipramina aumentan el comportamiento de "climbing". (87) Prozac® 20mg (fluoxetina), es un medicamento innovador apropiado en la presente investigación ya que los diferentes tratamientos evaluados también aumentan el tiempo de swimming en comparación al tiempo de climbing, lo que facilita su comparación a pesar de que la fluoxetina se puede

sustituir con otros fármacos que también presentan el mismo mecanismo de acción, es utilizado frecuentemente como fármaco patrón en otros estudios.

Tradicionalmente, *Viola tricolor* L. ha sido recomendada por sus propiedades sedantes. Ghorbani et al., 2012, investigaron en el extracto hidroalcohólico (70% etanol) de las partes aéreas de *V. tricolor* L. (HAE) en dosis de 50, 75, 100, 150, 200, 300 mg/kg, i.p. y su correspondiente fraccionamiento en fracción de agua (WF), fracción de acetato de etilo (EAF) y fracción de N-butanol (NBF) en una dosis de 200 mg/kg, i.p., las cuales se administraron a ratones, 30 minutos antes de la inyección de pentobarbital (30 mg/kg, i.p.). Los resultados indicaron que el HAE, a una dosis de 300 mg/kg, prolongó significativamente (34%) la duración del sueño inducido por pentobarbital, así mismo, la EAF aumentó significativamente la duración del sueño en 51%, demostrando que *V. tricolor* L. potencia la hipnosis con pentobarbital y que los componentes responsables de este efecto se encuentran probablemente en la fracción de acetato de etilo (EAF), que presenta compuestos de polaridad intermedia, entonces lo que favorece el papel de los flavonoides ya que posiblemente estos actúen a través de la modulación alostérica positiva del complejo del receptor GABA_A en la prolongación del sueño. (25) En relación al tratamiento de la depresión, Möhler, 2012, ha sugerido que las benzodiazepinas tienen un efecto antidepresivo por sí mismas a través de su acción sobre los receptores GABA_A. (128) Flores et al., 2017, afirma que existe evidencia suficiente para considerar que el sistema GABAérgico desempeña un papel importante en la etiopatogenia de la depresión, tanto estudios en animales como aportaciones clínicas coinciden en la importancia que dicho sistema tiene sobre la presencia de síntomas depresivos. (129) Por ello Estrada et al., califica a los flavonoides como una nueva familia de benzodiazepinas, con la ventaja de no presentar los efectos colaterales que éstas producen. (5)

Por otro lado Slattery et al., 2004, demostraron que los receptores GABA_B desempeñan un papel en el comportamiento similar a los antidepresivos en la FST modificada. Los antagonistas del receptor GABA_B disminuyeron el tiempo de inmovilidad a través de un aumento en el swimming. Este perfil es similar al producido por los antidepresivos serotoninérgicos, lo que sugiere que los antagonistas del receptor GABA_B pueden reclutar mecanismos serotoninérgicos

para provocar sus efectos en el comportamiento. (130) Más tarde, Asaoka et al., 2017, demuestra que la inhibición de los receptores GABA_B postsinápticos en las neuronas serotoninérgicas aumenta la actividad serotoninérgica. (131)

Viola odorata L. se ha utilizado tradicionalmente para el tratamiento de trastornos neuropsiquiátricos, recientemente Karim et al., 2018, investigaron los efectos antidepresivos de fitoconstituyentes aislados que incluyen tres flavonoides; 5,7-dihidroxi-3,6-dimetoxiflavona [1]; 5,7,4'-trihidroxi-3',5'dimetoxiflavona [2] y 5,7,4'-Trihidroxi-3'-metoxiflavona [3] de toda la planta de *Viola odorata* L. y su posible mecanismo de acción usando antagonistas del sistema serotoninérgico, dopaminérgico y adrenérgico. Para evaluar los efectos antidepresivos, utilizaron modelos animales clásicos de depresión, como la prueba de suspensión de cola (TST) y la prueba de natación forzada (FST) con ratones, donde los resultados indicaron que los compuestos [1], [2], y [3] en la dosis de 1, 10 y 30 mg/kg, i.p., disminuyeron significativamente el tiempo de inmovilidad en la FST y la TST en ratones. Para experimentos que involucran la determinación de mecanismos, los ratones fueron tratados previamente con 5-HT, dopamina y antagonistas adrenérgicos. En conclusión, Karim et al., hallaron en este estudio que los compuestos flavonoides [1], [2], y [3] poseen efectos similares a los de los antidepresivos y que estos podrían mediarse a través del sistema serotoninérgico. (31) De manera similar, varios autores (Machado et al, 2008; Li-Tao, 2008; Kawabata et al, 2010) afirman que los flavonoides de las plantas serían los responsables de la actividad antidepresiva. (5)

Caso contrario reportaron Muhammad et al., 2013, que investigaron las propiedades neurofarmacológicas en otra especie de la familia violaceae, en el extracto de n-hexano de la planta entera de *Viola betonicifolia*, utilizado como sedante y en varios trastornos nerviosos en las medicina tradicional pakistaní. Los resultados sugirieron que el extracto de n-hexano de *V. betonicifolia*, tiene actividad ansiolítica, relajante muscular, sedante; pero no ocurre lo mismo con la actividad antidepresiva determinada mediante la FST a dosis de 0.3, 0.4 y 0.5 mg/kg, en el cual se determinó que no presenta efecto antidepresivo en ninguna de estas dosis con fluoxetina, como fármaco patrón, más bien se observó una depresión del SNC dependiente de la dosis en la FST. (132)

El presente estudio demuestra que los extractos etanólico, flavonoídico y fracciones ricas en flavonoides FR2 y FR3 de *Viola tricolor* L., reducen significativamente alto el tiempo de inmovilidad al ser administrados vía oral en ratones especie *Mus músculus*, cepa Balb/c/CNPB sometidos a la FST modificado lo que sugieren que *Viola tricolor* L., tendría efectos similares a los antidepresivos; además debemos considerar que el tiempo de swimming es mayor con respecto al tiempo de climbing lo que indicaría una posible acción por un mecanismo serotoninérgico, tal como se encontraron en *V. odorata* L., y que los componentes principales responsables de este efecto se encuentran más probablemente en compuestos tipo flavonoide.

Por último, se menciona que en el siguiente trabajo existe la posibilidad de sesgo, con respecto al ambiente en que fueron acogidos los animales de experimentación considerando que los factores que afectan la prueba de nado forzado serían el ruido y las condiciones de crianza antes del experimento.

CONCLUSIONES

1. Los extractos etanólico, flavonoídico y fracciones flavonoídicas FR2 y FR3 de *Viola tricolor* L. “pensamiento” administrados por vía oral presentan actividad antidepresiva en la prueba de nado forzado modificado en ratones Balb/c/CNPB, mediante un posible mecanismo de acción serotoninérgico. Los metabolitos responsables serían flavonoides tipo glicósidos de flavona y flavonol.
2. Se determinó el porcentaje de humedad de las partes aéreas (flores de color violeta y tallo) de *Viola tricolor* L. “pensamiento” en tres determinaciones dando como resultado un promedio de 86.08%.
3. Se obtuvieron los extractos etanólico y flavonoídico de *Viola tricolor* L. “pensamiento”, el extracto etanólico se realizó por maceración en etanol al 70% y el extracto flavonoídico por sonicación con cloroformo y metanol.
4. Se determinó el porcentaje de rendimiento del extracto etanólico de *Viola tricolor* L. obteniéndose 18.84%, del extracto flavonoídico se obtuvo 7.11% y las dos fracciones mayoritarias fueron la FR1 y FR2 con 14.19 y 11.75%, respectivamente, pero la FR1 es una fracción susceptible a contaminación microbiana, por ello fue difícil determinar su actividad antidepresiva por ende se optó trabajar con la FR2 y FR3 (8.20%). Se estableció que los extractos etanólico y flavonoídico son solubles en solventes polares. Además el análisis fitoquímico cualitativo de los extractos etanólico y flavonoídico de *Viola tricolor* L. “pensamiento” mostraron compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, glicósidos, azúcares reductores, taninos.
5. Se separó las fracciones flavonoídicas (FR1 – FR7) a partir del extracto flavonoídico de *Viola tricolor* L. “pensamiento” por Cromatografía en Columna, de las cuales se eligieron dos fracciones: FR2 y FR3 para poder determinar su actividad antidepresiva.
6. Se identificó por espectroscopia UV/Vis los principales tipos de flavonoides presentes en las fracciones flavonoídicas de *Viola tricolor* L. “pensamiento”, encontrándose flavonoides tipo glicósidos de flavona y flavonol, los cuales serían los responsables de la actividad antidepresiva.
7. Se determinó el tiempo de inmovilidad de los extractos etanólico, flavonoídico y fracciones FR2 y FR3 de las partes aéreas de *Viola tricolor* L. “pensamiento”

en la prueba de nado forzado modificado, administrados por vía oral con fluoxetina como fármaco patrón para determinar la actividad antidepresiva, observándose una disminución significativamente alto del tiempo de inmovilidad en ratones tratados con el extracto etanólico a las dosis de 750, 500 y 250 mg/kg (14 ± 8.944 , 28 ± 30.943 y 31 ± 26.077 segundos respectivamente), con el extracto flavonoídico disminuyeron a 750 y 500 mg/kg (24 ± 12.942 y 25 ± 20.31 segundos respectivamente), con la FR2 disminuyeron a 360 mg/kg (27 ± 23.076 segundos), y con la FR3 disminuyeron a 360 y 90 mg/kg (8 ± 4.472 y 16 ± 16.355 segundos respectivamente), comparado con fluoxetina a 20 mg/kg y solución salina al 0.9% a 0.2ml/20g (68 ± 35.461 y 168 ± 5.701 segundos respectivamente).

8. Se evaluó los indicadores de depresión swimming y climbing en la prueba de nado forzado modificado tratados con los extractos etanólico, flavonoídico y fracciones FR2 y FR3 de *Viola tricolor* L. "pensamiento"; se observó un incremento de forma altamente significativo del tiempo de swimming con respecto al tiempo de climbing en ratones tratados con el extracto etanólico a las dosis de 500 y 750 mg/kg (235 ± 26.458 y 231 ± 60.457 segundos respectivamente) y flavonoídico a 500 y 750 mg/kg (259 ± 12.450 y 258 ± 18.235 segundos respectivamente), con la FR2 fue mayor a 360 y 180 mg/kg (241 ± 42.485 y 221 ± 35.071 segundos respectivamente) y con la FR3 fue mayor a las dosis de 360, 180 y 90 mg/kg (256 ± 22.749 , 234 ± 43.932 y 229 ± 29.026 segundos respectivamente), comparado con fluoxetina a 20 mg/kg y solución salina al 0.9% a 0.2ml/20g (170 ± 29.791 y 123 ± 5.701 segundos respectivamente); lo que indicaría que la actividad antidepresiva podría medirse por un mecanismo de acción serotoninérgico.

RECOMENDACIONES

1. A las autoridades y docentes

- ❖ Implementar los laboratorios de la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica, con equipos dedicados a la investigación científica para facilitar la ejecución de los trabajos de investigación y su respectiva capacitación.
- ❖ Seguir motivando económicamente a la realización de proyectos de investigación en relación al uso de las plantas de la región del Cusco.
- ❖ Apoyar en los trabajos de investigación que requieran su orientación y consejería e incentivar a los alumnos al estudio de metabolitos responsables de las plantas causantes de diferentes efectos.

2. Al personal de salud

- ❖ Fomentar el uso de plantas medicinales, con la difusión de revistas, boletines informativos, medios de comunicación, internet, acerca de los trabajos de investigación en la Universidad.

3. A los investigadores

- ❖ Analizar y estudiar los efectos terapéuticos de las plantas para conocer los principios activos responsables de cortar, aliviar o curar las enfermedades, separarlos de las plantas que lo contienen, determinar sus estructuras químicas, procurar su síntesis, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad.
- ❖ Realizar estudios de toxicidad aguda y crónica de *Viola tricolor* L. "pensamiento".
- ❖ Realizar el efecto antidepresivo en los otros colores de los pétalos de *Viola tricolor* L., excepto los pétalos de color violeta estudiados en la presente investigación.
- ❖ Identificar la molécula o moléculas responsables de la actividad antidepresiva de *Viola tricolor* L.
- ❖ Realizar estudios neuroquímicos para establecer el mecanismo de acción por la que se da la actividad antidepresiva de *Viola tricolor* L, utilizando antagonistas del sistema serotoninérgico, dopaminérgico y adrenérgico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Posada J. La salud mental en Colombia. *Biomédica*. [Internet]. 2013 Diciembre [citado 03 Enero 2019]; 33(4): p. 497-498. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572013000400001&lng=en.
2. Ministerio de Salud del Perú: Salud Mental es sentirse bien contigo y los demás. [Internet]. 2015 [citado 04 Diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.minsa.gob.pe/portada/Especiales/2015/saludmental/index.asp>.
3. Escamilla B., Moreno P. Plantas medicinales de La Matamba y El Piñoral, municipio de Jamanpa, Veracruz. Primera ed. Veracruz, México; 2015.
4. Richelson E. Pharmacology of antidepressants-characteristic of the ideal drug. *Mayo Clin Proc*. [Internet]. 1994 Noviembre [citado 03 Enero 2019]; 69(11): p. 1069-1081. Disponible en: [https://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196\(12\)61375-5/pdf](https://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196(12)61375-5/pdf)
5. Estrada R., Ubaldo D., Araujo A. Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud Ment*. [Internet]. 2012 Septiembre – Octubre [citado 03 Enero 2019]; 35(5): p. 375-378. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/sm/v35n5/v35n5a4.pdf>
6. World Health Organization: Depresión. [Internet]; 2018 [citado 04 Diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/depression>.
7. Salman S., Idrees J., Hassan F., Idrees F., Arifullah M., Badshah S. Predictive factors of suicide attempt and non-suicidal self-harm in emergency department. *Emerg (Tehran)*. [Internet]. 2014 [citado 03 Enero 2019]; 2(4): p. 166-169. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4614564/pdf/emerg-2-166.pdf>
8. Oficina de Estadística e Informática. Compendio Estadístico 2017. Instituto Nacional de Salud Mental "Honorio Delgado – Hideyo Noguchi"; 2018.
9. Oficina de Estadística e Informática. Compendio Estadístico 2016. Instituto Nacional de Salud Mental "Honorio Delgado – Hideyo Noguchi"; 2017.
10. Cortajarena M., Ron S. Antidepresivos en la tercera edad. *SEMERGEN*. [Internet]. 2016 [citado 04 Enero 2019]; 42(7): p. 458-463. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-familia-semergen-40-pdf-S1138359315002993>
11. Spigset O., Martensson B. Fortnightly review: Drug treatment of depression. *British Medical Journal*. [Internet]. 1999 [citado 04 Enero 2019]; 318: p. 1188-1191. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/13076404_Fortnightly_review_Drug_treatment_of_depression

12. Roersch C. Plantas medicinales en sur andino del Perú. Santo Domingo ed. República Dominicana; 1994.
13. Akhondzadeh S., Naghavi H., Vazirian M., Shayeganpour A., Rashidi H., Khani M. Passionflower in the treatment of generalized anxiety: a pilot double-blind randomized controlled trial with oxazepam. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. [Internet]. 2001 Octubre [citado 04 Enero 2019]; 26(5): p. 363-367. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/1c82/4dfbaa54980e8f52d67f66ca057d9f66f05b.pdf>
14. UNSAAC - Dirección de Gestión de la Investigación. Líneas de Investigación UNSAAC 2018 - 2021. Cusco: UNSAAC - Vicerrectorado de Investigación; 2017.
15. Ministerio de Salud. Minsa. [Internet]. 2018 [citad 10 Diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.minsa.gob.pe/?op=51¬a=18754>.
16. Fernández A. Diversidad de especies de la Familia Violaceae Batsch (Malpighiales) en Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú. Caracas, Venezuela: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Centro de Biofísica y Bioquímica; 2009.
17. Berenzon S., Alanís S., Saavedra N. El uso de las terapias alternativas y complementarias en población mexicana con trastornos depresivos y de ansiedad: resultados de una encuesta en la Ciudad de México. *Salud Mental*. [Internet]. 2009 Marzo-Abril [citado 06 Enero 2019]; 32(2): p. 107-115. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=58212275003>
18. Serafín L. Brevisima historia de la depresión. [Internet]. 2012 [citado 20 Diciembre 2018]. Disponible en: <http://e-ciencia.com/blog/divulgacion/brevisima-historia-de-la-depresion/>.
19. Madroñero R. Química Médica: Métodos fundamentales en la búsqueda de nuevos fármacos. Primera ed.: Alambra S.A.; 1980.
20. Monti B., Jaime M. La hipótesis serotoninérgica de la depresión. *Revista de Psiquiatría de Uruguay*. [Internet]. 1998 Abril [citado 06 Enero 2019]; 62(1): p. 19-22. Disponible en: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=231455&indexSearch=ID>
21. Travé A., Reneses A. Manejo de los fármacos en el tratamiento de la depresión. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. [Internet]. 2002 [citado

- 06 Enero 2019]; 26(1-8). Disponible en: http://www.msobs.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/vol26_1_depresion.pdf
22. Sánchez A. Psicofarmacología de la depresión. Grupo Español de Investigación Cooperativa en Psicobioquímica Clínica. [Internet]. 2013 [citado 08 Enero 2019]; 2: p. 37-51. Disponible en: http://www.psicobioquimica.org/documentos/revistas/cancer_depresion/001/04.pdf
23. Sanabria W.A. Utilización de plantas medicinales en la práctica psiquiátrica. [Internet]. 2012 [citado 20 Diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/bibliotecas/bhp/cupula/v23n1-2/art3.pdf>.
24. Bakhshaei S. Phyto-Pharmacological Effect of Nine Medicinal Plants as a Traditional Treatment on Depression. J Appl Pharm. [Internet]. 2017 Junio [citado 08 Enero 2019]; 9(3). Disponible en: <https://www.omicsonline.org/open-access/phytopharmacological-effect-of-nine-medicinal-plants-as-a-traditional-treatment-on-depression-1920-4159-1000244.pdf>
25. Ghorbani A., Javadi N., Rakhshandeh H. Effect of Viola tricolor on pentobarbital-induced sleep in mice. Afr J Pharm Pharmacol. [Internet]. 2012 Septiembre [citado 08 Enero 2019]; 6(35): p. 2503-2509. Disponible en: http://www.academicjournals.org/app/webroot/article/article1380799976_Ghorbani%20et%20al.pdf
26. Harati E., Mohseni S., Rajani S., Sadeghipour H. The Effect of Viola Tricolor L. Flower Hydro-Alcoholic Extract on Anxiety-Like behavior in a mouse model of chronic asthma. World Family Medicine. [Internet]. 2018 Febrero [citado 08 Enero 2019]; 16(2): p. 263-269. Disponible en: <http://www.mejfm.com/February%202018/Viola.pdf>
27. Rahimi V., Askari V., Hosseini M., Yousefsani B., Sadeghnia H. Anticonvulsant Activity of Viola tricolor against Seizures Induced by Pentylentetrazol and Maximal Electroshock in Mice. Iran J Med Sci. [Internet]. 2017 Diciembre [citado 08 Enero 2019]. Disponible en: <http://ijms.sums.ac.ir/index.php/IJMS/article/view/4406/1266>
28. Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología: Neurociencias, en busca de nuevos tratamientos contra la depresión. [Internet]. 2018 [citado 21 Diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.conricyt.mx/noticia-detalle.php?noti=424>.
29. Ccana G. Cribado de Actividad Antidepresiva en la prueba de natación forzada y toxicidad aguda en ratones Balb/c/CNPB de los extractos secos etanólicos de las partes aéreas en floración del hypericum andinum, hypericum brevistylum, hypericum laricifolium e hypericum silenoides. Tesis de pregrado. Cusco, Perú:

- Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2011.
30. Laines G. Estudio del efecto Antidepresivo del extracto Hidroalcohólico de hojas de *Hypericum Laricifolium* (Chinchango) en ratones Albinos. Tesis de maestría. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2010.
 31. Karim N., Khan I., Abdelhalim A., Khan A., Halim S.A. Antidepressant potential of novel flavonoids derivatives from sweet violet (*Viola odorata* L): Pharmacological, biochemical and computational evidences for possible involvement of serotonergic mechanism. *Fitoterapia*. [Internet]. 2018 Mayo [citado 09 Enero 2019]; 128: p. 148–161. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X18306038>
 32. Kedzierska E, Wach I. Using tests and models to assess antidepressant-like activity in rodents. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci*. [Internet]. 2016 Marzo [citado 09 Enero 2019]; 29(2): p. 61-65. Disponible en: <https://content.sciendo.com/view/journals/cipms/29/2/article-p61.xml>
 33. Piana M., Zadra M., Faccim de Brum T., Fernandes A., Boligon A., Correa R., et al. Analysis of Rutin in the Extract and Gel of *Viola tricolor*. *Journal of Chromatographic Science*. [Internet]. 2013 Octubre [citado 09 Enero 2019]; 51: p. 406–411. Disponible en: <https://academic.oup.com/chromsci/article/51/5/406/326311>
 34. Schumacher J., Piana M., Forbrig A., Leitão A., Corrêa da Cruz R., Borba de Freitas R., et al. Doseamento de flavonóides em extrato liofilizado de *Viola tricolor* L. *Revista Contexto & Saúde*. [Internet]. 2011 Enero [citado 09 Enero 2019]; 10(20): p. 907-910. Disponible en: <https://www.revistas.unijui.edu.br/index.php/contextoesaude/article/download/1692/1403>
 35. Vukics V. Antioxidant Flavonoid Glycosides in *Viola tricolor* L. Tesis Postdoctoral. Budapest: Semmelweis University, School of Pharmaceutical Sciences; [Internet]. 2009 [citado 10 Enero 2019]. Disponible en: <https://www.yumpu.com/en/document/read/7191272/glycosides-in-viola-tricolor-l>
 36. Machado D., Bettio L., Cunha M., Santos A., Pizzolatti M., Brighente I., et al. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Eur. J. Pharmacol*. [Internet]. 2008 Junio [citado 10 Enero 2019]; 587(1-3): p. 163-168. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299908003580?via%3Dihub>

37. Vukics V., Hevesi B., Ringer T., Ludanyi K., Kery A., Bonn G., et al. Quantitative and Qualitative Investigation of the Main Flavonoids in Heartsease (*Viola tricolor* L.). *J Chromatogr Sci.* [Internet]. 2008 Febrero [citado 10 Enero 2019]; 46(2): p. 97-101. Disponible en: <https://academic.oup.com/chromsci/article-pdf/46/2/97/973704/46-2-97.pdf>
38. Fonnegra R., Jiménez S.L. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Segunda ed. Colombia: Universidad de Antioquia; 2007.
39. Chevallier A. Enciclopedia de Plantas Medicinales Madrid: Acento; 1997.
40. Toiu A., Verite P., Oniga I., Mircea T. Composition of essential oils of *Viola tricolor* and *V. arvensis* from Romania. *Chemistry of Natural Compounds.* [Internet]. 2009 Enero [citado 10 Enero 2019]; 45(1). Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/225677425_Composition_of_essential_oils_of_Viola_tricolorand_V_arvensisfrom_Romania
41. Zhang Z. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sci.* [Internet]. 2004 Agosto [citado 10 Enero 2019]; 75(14): p. 1659-1699. Disponible en: <https://eurekamag.com/pdf/004/004366346.pdf>
42. Sollozo M., Estrada E., López C. Medicina tradicional: estudios preclínicos de plantas con propiedades ansiolíticas. *El residente.* [Internet]. 2011 Mayo-Agosto Enero [citado 10 Enero 2019]; VI(2): p. 78-84. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/residente/rr-2011/rr112c.pdf>
43. González M., López I., González M., Tena J. Plantas Medicinales del estado de Durango y Zonas Aledañas. México, D.F.: Instituto Politécnico Nacional; 2004.
44. Carlini E.A. Plants and the central nervous system. *Pharmacol Biochem Behav.* [Internet]. 2003 Junio [citado 10 Enero 2019]; 75(3): p. 501-512. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305703001126?via%3Dihub>
45. Kasper S. Clinical efficacy in depression. In Müller WE, editor. *St. John's Wort and its Active Principles in Depression and Anxiety.* 2005. p. 123-131.
46. Khushboo, Sharma B. Antidepressants: mechanism of action, toxicity and possible amelioration. *J Appl Biotechnol Bioeng.* [Internet]. 2017 Septiembre [citado 10 Enero 2019]; 3(5): p. 437-448. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/321079742_Antidepressants_Mechanism_of_Action_Toxicity_and_Possible_Amelioration

47. Panche A., Diwan A., Chandra S. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*. [Internet]. 2015 Octubre [citado 10 Enero 2019]; 5(47). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5465813/pdf/S2048679016000410a.pdf>
48. Kühnau J. The Flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet*. [Internet]. 1976 [citado 10 Enero 2019]; 24: p. 117-190. Disponible en: <https://www.karger.com/Article/Abstract/399407>
49. Martínez S., González J., Culebras J.M., Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*. [Internet]. 2002 [citado 10 Enero 2019]; 17(6): p. 271-278. Disponible en: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>
50. Wu T., He M., Zang X., Zhou Y., Qiu T., Pan S., et al. A structure-activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. *Biochimica et Biophysica Acta*. [Internet]. 2013 Noviembre [citado 13 Enero 2019]; 1828(11): p. 2751-2756. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273613002757>
51. Olsen R.W., Sieghart W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid_A receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev*. [Internet]. 2008 Septiembre [citado 13 Enero 2019]; 60(3): p. 243-260. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2847512/pdf/nihms187538.pdf>
52. German L.J., Rosas G.U., Rivadeneyra E., Rodríguez J.F. Advances in the Preclinical Study of Some Flavonoids as Potential Antidepressant Agents. *Scientifica*. [Internet]. 2018 Febrero [citado 13 Enero 2019]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/scientifica/2018/2963565/>
53. Cartaya O., Reynaldo I. Flavonoides: Características Químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales - Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*. [Internet]. 2001 [citado 13 Enero 2019]; 22(2): p. 5-14. Disponible en: <https://www.redalyc.org/html/1932/193215009001/>
54. Andersen Ø.M, Markham K.R. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications* Londres: Taylor & Francis Group; 2006.
55. Mitsubishi Chemical. *DIAION Technical Manual*. Mitsubishi Chemical Corporation.
56. Lock O. *Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales*. Segunda ed. Pontificia Universidad Católica del Perú, editor. Lima: Fondo editorial; 1994.

57. Pinheiro P., Justino G. Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds - A Review of Spectroscopic Applications, Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health Portugal; 2012.
58. Lock O. Colorantes Naturales. Primera ed. Lima: Fondo Editorial; 1997.
59. Leal R.A. Búsqueda de ayuda en salud mental en los adolescentes. Rev. Perspectiva. [Internet]. 2017 Diciembre [citado 14 Enero 2019]; 18(4): p. 347-351. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/321907181_Busqueda_de_ayuda_en_salud_mental_en_los_adolescentes
60. Katz G., Lazcano E., Madrigal E. La salud mental en el ámbito poblacional: la utopía de la psiquiatría social en países de bajos ingresos. Salud Pública de México. [Internet]. 2017 julio-agosto [citado 14 Enero 2019]; 59(4): p. 351-353. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v59n4/0036-3634-spm-59-04-00351.pdf>
61. Piazza M. & Fiestas F. Prevalencia anual de los trastornos y uso de servicios en salud mental en el Perú: resultados del Estudio Mundial de Salud Mental, 2005. Rev Peru Med Exp Salud Pública. [Internet]. 2014 [citado 14 Enero 2019]; 31(1): p. 30-38. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v31n1/a05v31n1.pdf>
62. Organización Mundial de la Salud. OMS: Trastornos mentales. [Internet]. 2018 [citado 12 Enero 2019]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs396/es/>.
63. Barraca J., Perez M. Activación conductual para el tratamiento de la depresión. Madrid. Síntesis S.A.; 2015.
64. Möller H.J., Bitter I., Bobbes J., Fountoulakis K., Höschl K., Kasper S. Position statement of the European Psychiatric Association (EPA) on the value of antidepressants in the treatment of unipolar depression. European Psychiatry. [Internet]. 2012 [citado 12 Enero 2019]; 27: p. 114-128. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924933811001398>
65. Suarez C. Planinsa: La depresión: Una patología compleja. [Internet]. 2009 [citado 10 Enero 2019]. Disponible en: <http://www.planinsa.com/php/articulos/articulo2.php>.
66. National Institute of Mental Health: Depression. [Internet]. 2016 [citado 10 Enero 2019]. Disponible en: <https://www.nimh.nih.gov/health/topics/depression/index.shtml>.
67. Tsuang M.T., Bar J.L., Stone W.S., Faraone S.V. Gene-environment interactions in mental disorders. World Psychiatry. [Internet]. 2004 Junio [citado 15 Enero

- 2019]; 3(2): p. 73-83. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1414673/pdf/wpa020073.pdf>
68. Garcia J.T., Rosete E.M. Tratamiento farmacológico de la depresión mayor. Revista Cubana de Medicina General Integral. [Internet]. 2002 Mayo-Junio [citado 15 Enero 2019]; 18(3): p. 57-70. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/mgi/vol18_3_02/mgi09302.htm
69. biopsicologia.net: Etiopatogenia de los trastornos afectivos. [Internet]. [citado 26 Diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.biopsicologia.net/es/nivel-4-patolog%C3%ADas/1.5.2.-etiopatogenia-de-los-trastornos-afectivos>.
70. Díaz B.A., González C. Actualidades en neurobiología de la depresión. Rev Latinoam Psiquiatría. [Internet]. 2012 Octubre [citado 15 Enero 2019]; 11(3): p. 106-115. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/psiquiatria/rp-2012/rp123i.pdf>
71. Ferre F. Afrontar la depresión: Guía de ayuda a pacientes y familiares. Fundación Juan José López-Ibor; Fundación Arpegio, editors.; 2009.
72. Freeman E.W., Sammel M.D., Lin H., Nelson D.B. Associations of hormones and menopausal status with depressed mood in women with no history of depression. Archives of General Psychiatry. [Internet]. 2006 Abril [citado 15 Enero 2019]; 63(4): p. 375-382. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/9475/c46a7499f7a34da022e128d9c549a93fbf5f.pdf>
73. Cohen L., Altshuler L., Harlow B., Nonacs R., Newport D.J., Viguera A., et al. Relapse of major depression during pregnancy in women who maintain or discontinue antidepressant treatment. Journal of the American Medical Association. [Internet]. 2006 Febrero [citado 16 Enero 2019]; 295(5): p. 499-507. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16449615>
74. Instituto Nacional de Salud Mental "Honorio Delgado - Hideyo Noguchi". Estudio Epidemiológico de Salud Mental en Lima Metropolitana y Callao Replicación 2012. Informe General. Anales de Salud Mental. 2013; XXIX.
75. Villalobos G. El psicólogo: Depresión. [Internet]. 2014 [citado 23 Diciembre 2018]. Disponible en: <http://villalobos83.blogspot.pe/2014/03/depresion.html>.
76. Pérez R. Tratamiento farmacológico de la depresión: actualidades y futuras direcciones. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM. [Internet]. 2017 Septiembre-Octubre [citado 16 Enero 2019]. 60(5). Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/facmed/v60n5/2448-4865-facmed-60-05-7.pdf>
77. Cuijpers P., Van Straten A., Warmerdam L., Andersson G. Psychotherapy versus the combination of psychotherapy and pharmacotherapy in the treatment of

- depression: a meta-analysis. *Depression & Anxiety*. [Internet]. 2009 [citado 16 Enero 2019]; 26(3): p. 279-288. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/da.20519>
78. Benedí J., Romero C. Antidepresivos. *Farmacia Comunitaria*. [Internet]. 2005 Noviembre [citado 16 Enero 2019]; 19(10). Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-pdf-13081504>
79. Goodman y Gildman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Novena ed. Madrid: McGraw-Hill / Interamericana de España, S.A.; 1998.
80. Agius M. & Bonnici H. Antidepressants in use in clinical practice. *Psychiatr Danub*. [Internet]. 2017 [citado 18 Enero 2019]; 29(3): p. 667-671. Disponible en: http://www.psychiatria-danubina.com/UserDocsImages/pdf/dnb_vol29_sup3/dnb_vol29_sup3_667.pdf
81. Chavez E., Ontiveros M.P., Serrano C. Los antidepresivos inhibidores selectivos de recaptura de serotonina (ISRS, ISR-5HT). *Salud Ment*. [Internet]. 2008 Agosto [citado 18 Enero 2019]; 31(4). Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/sm/v31n4/v31n4a8.pdf>
82. National Institute for health and care Excellence. NICE: Depression in adults. Recognition and management. [Internet]. 2009 [citado 16 Enero 2019]. Disponible en: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg90>.
83. Katzung B. *Farmacología Básica y Clínica*. Novena ed.: El Manual Moderno S.A.; 2005.
84. Litter M. *Compendio de Farmacología*. Tercera ed.: El Ateneo; 1984.
85. *Información Amplia Para Prescribir Prozac*. México: Eli Lilly y Compañía de México, S.A.; 2016.
86. Nestler E.J., Hyman S.E. Animal Models of Neuropsychiatric Disorders. *Nat Neurosci*. [Internet]. 2010 Octubre [citado 18 Enero 2019]; 13(10). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3750731/pdf/nihms497810.pdf>
87. Abelaira H.M., Réus G.Z., Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Rev Bras Psiquiatr*. [Internet]. 2013 [citado 18 Enero 2019]; 35(2). Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbp/v35s2/1516-4446-rbp-1516-4446-2013-S112.pdf>
88. Frazer A., Morilak D.A. What should animal models of depression model. *Neurosci Biobehav Rev*. [Internet]. 2005 [citado 18 Enero 2019]; 29: p. 515-523. Disponible en: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/2161686/mod_resource/content/1/What%20should%20animal%20models%20of%20depression%20model%20-%20Frazer%20%20Morilak%202005.pdf

89. McArthur R., Borsini F. Animal models of depression in drug discovery: A historical perspective. *Pharmacol Biochem Behav.* [Internet]. 2006 Julio [citado 18 Enero 2019]; 84(3): p. 436-452. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305706001808>
90. Porsolt R.D., Antón G., Blavet N., Jalfre M. Behavioural despair in rats, a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* [Internet]. 1978 Febrero [citado 18 Enero 2019]; 47(4): p. 379-391. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014299978901188?via%3Dihub>
91. López R. Actividad ansiolítica, efecto antidepresivo y caracterización química de *Castilleja tenuiflora* Benth. México. Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Biotecnología; 2014.
92. Cryan J.F., Markou A., Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci.* [Internet]. 2002 Mayo [citado 20 Enero 2019]; 23(5): p. 238-245. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165614702020175>
93. Rodríguez J.F., Contreras C.M. Los fármacos antidepresivos y la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado: participación de los sistemas de neurotransmisión. *Arch Neurocién.* [Internet]. 2000 [citado 20 Enero 2019]; 5(2): p. 74-83. Disponible en: http://www.imbiomed.com/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=760&id_seccion=21&id_ejemplar=100&id_revista=5
94. Alguacil L.F., Álamo C., Iglesias V. Contribución de los estudios preclínicos al conocimiento y terapéutica de la depresión. *Psicothema.* [Internet]. 1996 [citado 20 Enero 2019]; 8(3): p. 657-667. Disponible en: <http://www.psicothema.com/pdf/61.pdf>
95. Petit-Demouliere B., Chenu F., Bourin M. Forced swimming test in mice: A review of antidepressant activity. *Psychopharmacology.* [Internet]. 2005 Febrero [citado 20 Enero 2019]; 177(3): p. 245–255. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/8121129_Forced_swimming_test_in_mice_A_review_of_antidepressant_activity
96. Psicoactiva.com: Diccionario de términos psicológicos. [Internet]. 2013 [citado 22 Enero 2019]. Disponible en: <https://www.psicoactiva.com/diccio/diccionario-de-psicologia.htm>.
97. Oceano Mosby. Diccionario de Medicina. Cuarta ed. España: MMII OCEANO; 2000.

98. Nugent, Pam M.S. PsychologyDictionary.org. [Internet]. 2018 [citado 22 Enero 2019]. Disponible en: <https://psychologydictionary.org/antinociceptive/>.
99. Mosby. Diccionario Mosby de Medicina, Enfermería y Ciencias de la Salud. Sexta ed.: Elsevier España; 2003.
100. Merriam-Webster.com. [Internet]. 2018 [citado 22 Enero 2019]. Disponible en: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/>.
101. The free dictionary Blog. [Internet]. 2014 [citado 22 Enero 2019]. Disponible en: <http://www.thefreedictionary.com/>.
102. Sánchez-Mateo C., Prado B., Rabanal R.M. Antidepressant effects of the methanol extract of several Hypericum species from the Canary Islands. J Ethnopharmacol. [Internet]. 2002 Enero [citado 22 Enero 2019]; 79(1): p. 119-127. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874101003932?via%3Dihub>
103. Feng R., Wang Q., Tong W., Xiong J., Wei Q., Zhou W., et al. Extraction and antioxidant activity of flavonoids of Morus nigra. Int J Clin Exp Med. [Internet]. 2015 Diciembre [citado 22 Enero 2019]; 8(12): p. 22328-22336. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4729996/pdf/ijcem0008-22328.pdf>
104. Chukwuma R., Uzoma O. Acute and subacute oral toxicity study on the flavonoid rich fraction of Monodora tenuifolia seed in albino rats. Asian Pac J Trop Biomed. [Internet]. 2014 Marzo [citado 22 Enero 2019]; 4(3): p. 194–202. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3868789/pdf/apjtb-04-03-194.pdf>
105. Wong M., Licinio J. Research and treatment approaches to depression. Nature Reviews Neuroscience. [Internet]. 2001 Mayo [citado 22 Enero 2019]; 2(5): p. 343-351. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/35072566>
106. Mishra S., Dwivedi A.K., Kulshreshtha K. To study the effect of texture of flower petal and moisture content during floral dehydration. International Journal of Latest Research in Science and Technology. [Internet]. 2014 Marzo-Abril [citado 22 Enero 2019]; 3(2): p. 144-146. Disponible en: http://www.mnkjournals.com/ijlrst_files/Download/Vol%203%20Issue%202/27-30-15042014%20To%20study%20the%20effect%20of%20texture%20of%20flower%20petal%20and%20moisture%20content%20during%20floral%20dehydration.pdf
107. Witkowska-Banaszczak E., Bylka W., Matyawska I., Goslinska O., Muszynski Z. Antimicrobial activity of Viola tricolor herb. Fitoterapia. [Internet]. 2005 Mayo [citado 25 Enero 2019]; 76: p. 458–461. Disponible en: <https://kundoc.com/pdf-antimicrobial-activity-of-viola-tricolor-herb-.html>

108. Sadeghnia H.R., Ghorbani T., Mortazavian S.M., Mousavi S.H., Tayarani-Najaran Z., Ghorbani A. Viola tricolor Induces Apoptosis in Cancer Cells and Exhibits Antiangiogenic Activity on Chicken Chorioallantoic Membrane. *BioMed Res Int*. [Internet]. 2014 Agosto [citado 25 Enero 2019]; 2014:625792. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4163403/pdf/BMRI2014-625792.pdf>
109. Toiu A., Muntean E., Oniga I., Tamas M. Pharmacognostic research on Viola tricolor L. (Violaceae). *Farmacia*. [Internet]. 2009 Enero [citado 25 Enero 2019]; 57(2). Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/51050127_Pharmacognostic_research_on_Viola_tricolor_L_Violaceae
110. Valencia E., Figueroa I., Sosa E., Bartolomé M., Martínez H, García M. Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*. [Internet]. 2017 Enero [citado 04 Febrero 2019]; 16. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/29781/1/2.%201583-4794-2-PB.pdf>
111. Cai Y., Luo Q., Sun M., Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*. [Internet]. 2004 [citado 04 Febrero 2019]; 74: p. 2157 – 2184. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320503011457?via%3Dihub>
112. Martínez I., Periago M., Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. [Internet]. 2000 Marzo [citado 04 Febrero 2019]; 50(1): p. 5-18. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262551532_Significado_nutricional_de_los_compuestos_fenolicos_de_la_dieta
113. Paredes J. Determinación estructural de flavonoides extraídos de Gevuina Avellana. Tesis Pedagogía en Biología y Química, Facultad de letras y educación. Universidad Austral de Chile; 1976.
114. Harborne J.B, Baxter H. *The Handbook of Natural Flavonoids*. 1st ed. Wiley, editor.; 1999.
115. Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Primera ed. Heidelberg SVB, editor.; 1970.
116. Vukics V., Ringer T., Kery A., Bonn G.K., Guttman A. Analysis of heartsease (Viola tricolor L.) flavonoid glycosides by micro-liquid chromatography coupled to multistage mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. [Internet]. 2008 Octubre [citado 25 Enero 2019]; 1206(1): p. 11–20. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967308008455?via%3Dihub>

117. Bravo A.V., Acuña W.D. Evaluación fitoquímica y determinación de flavonoides en hojas de *Ficus benjamina* L. Xilema. [Internet]. 2015 [citado 25 Enero 2019]; 28. Disponible en: <http://revistas.lamolina.edu.pe/index.php/xiu/article/viewFile/599/582>
118. Mulder-Krieger T., Verpoorte R. Anthocyanins as flower pigments. Primera ed. Netherlands S, editor.; 1994.
119. Fugmann B., Lang-Fugmann S., Steglich W. RÖMPP Encyclopedia Natural Products. Primera ed. Verlag GT, editor.; 2000.
120. Qi C.C., Ding Y.Q., Zhou J.N. Biological Factors Influencing the Mice Forced Swim Test. *J Neurol Neuromedicine*. [Internet]. 2016 Julio [citado 25 Enero 2019]; 1(4): p. 21-24. Disponible en: <http://www.jneurology.com/articles/biological-factors-influencing-the-mice-forced-swim-test.pdf>
121. Can A., Dao D.T., Arad M., Terrillion C.E., Piantadosi S.C., Gould T.D. The Mouse Forced Swim Test. *Journal of Visualized Experiments*. [Internet]. 2012 Enero [citado 25 Enero 2019]; (59). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3353513/pdf/jove-59-3638.pdf>
122. Masuda Y., Ishigooka S., Matsuda Y. Behaviors of Mice Given Forced-Swimming. *Exp Anim*. [Internet]. 2001 Enero [citado 25 Enero 2019]; 50(4): p. 331-335. Disponible en: https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/50/4/50_4_331/_pdf/-char/en
123. Cassano P., Argibay P. La enfermedad depresiva y sus modelos animales. *Rev Hosp Ital B Aires*. [Internet]. 2009 Diciembre [citado 25 Enero 2019]; 29(2). Disponible en: https://www1.hospitalitaliano.org.ar/multimedia/archivos/noticias_attachs/47/documentos/7485_117-120-cassano.pdf
124. Petit-Demouliere B., Chenu F., Bourin M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology*. [Internet]. 2005 Febrero [citado 25 Enero 2019]; 177: p. 245–255. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/8121129_Forced_swimming_test_in_mice_A_review_of_antidepressant_activity
125. Álvarez-Suárez P., Banqueri M, Vilella M, Méndez M, Arias J L. The effect of recording interval length on behavioral assessment using the forced swimming test. *Revista Iberoamericana de Psicología y Salud*. [Internet]. 2015 Mayo [citado 28 Enero 2019]; 6: p. 90-95. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S217120691500006X>

126. Page M.E., Detke M.J., Dalvi A., Kirby L.G., Lucki I. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology*. [Internet]. 1999 Junio [citado 28 Enero 2019]; 147: p. 162–167. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.379.3815&rep=rep1&type=pdf>
127. Bogdanova O.V., Kanekar S., D'Anci K.E., Renshaw P.F. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiology & Behavior*. [Internet]. 2013 Mayo [citado 28 Enero 2019]; 118: p. 227–239. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5609482/pdf/nihms873494.pdf>
128. Möhler H. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology*. [Internet]. 2012 [citado 28 Enero 2019]; 62(1): p. 42-53. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002839081100373X>
129. Flores-Ramos M., Salinas M., Carvajal-Lohr A., Rodríguez-Bores L. El papel del ácido gamma-aminobutírico en la depresión de la mujer. *Gaceta Médica de México*. [Internet]. 2017 [citado 28 Enero 2019]; 153: p. 486-495. Disponible en: https://www.anmm.org.mx/GMM/2017/n4/GMM_153_2017_4_486-495.pdf
130. Slattery D.A., Desrayaud S., Cryan J.F. GABA_B Receptor Antagonist-Mediated Antidepressant-Like Behavior Is Serotonin-Dependent. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. [Internet]. 2005 [citado 28 Enero 2019]; 312(1). Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/8378062_GABAB_Receptor_Antagonist-Mediated_Antidepressant-Like_Behavior_Is_Serotonin-Dependent
131. Asaoka N., Nishitani N., Kinoshita H., Kawai H., Shibui N., Nagayasu K., et al. Chronic antidepressant potentiates spontaneous activity of dorsal raphe serotonergic neurons by decreasing GABA_B receptor-mediated inhibition of L-type calcium channels. *Scientific Reports*. [Internet]. 2017 octubre [citado 28 Enero 2019]; 7(13609). Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5648823/pdf/41598_2017_Article_13599.pdf
132. Muhammad N., Saeed M., Khan H., Haq I. Evaluation of n-hexane extract of *Viola betonicifolia* for its neuropharmacological properties. *Journal of Natural Medicines*. [Internet]. 2013 [citado 28 Enero 2019]; 67(1): p. 1–8. Disponible en: http://www.academia.edu/11262258/Evaluation_of_n-hexane_extract_of_Viola_betonicifolia_for_its_neuropharmacological_properties

ANEXOS

**ANEXO N° 1: CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE LA
ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO EMITIDO POR EL HERBARIO VARGAS
(CUZ)**

HERBARIO VARGAS (CUZ)

CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN TAXONÓMICA N° 005-2018-HVC-FCB-UNSAAC

La directora del Herbario Vargas (CUZ) -Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), deja constancia que: la señorita **Roxana Cahuana Lloclla** con código 114255 y señor **Yon Aguilar Quispe** con código 111276, Bachilleres de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, han presentado a la Dirección del Herbario Vargas (CUZ) muestras de plantas para su determinación taxonómica (expediente N001406), para el proyecto de tesis intitulado "Estudio de la actividad antidepressiva del extracto etanólico, flavonóidico y fracciones mayoritarias de *Viola tricolor* (pensamiento), usando el método de nado forzado modificado". La que al ser diagnosticada por la M.Sc. Gloria Calatayud Hermoza, utilizando claves dicotómicas, consulta con bibliografía especializada, y comparación con muestras del Herbario, concuerdan con la clasificación del grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group-APG IV, 2016).

N°	FAMILIA	ESPECIES
I	Violaceae	<i>Viola tricolor</i> L.

Se le expide la presente certificación a petición formal de los interesados para los fines que vieran por conveniente.

Cusco, 20 de Marzo de 2018.

.....
Bлга. María Luisa Ochoa Cámara
Directora del Herbario Vargas (CUZ)



**ANEXO N° 2: CERTIFICADO SANITARIO DE LOS ANIMALES DE
EXPERIMENTACIÓN EMITIDO POR EL BIOTERIO DEL INSTITUTO
NACIONAL DE SALUD**

	INSTITUTO NACIONAL DE SALUD CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS COORDINACIÓN DE BIOTERIO
CERTIFICADO SANITARIO N° 094- 2018	
Producto : Ratón albino	Lote N° : M-16-2018
Especie : <i>Mus musculus</i>	Cantidad : 100
Cepa : Balb/c/CNPB	Edad : 21 a 23 días
Peso : 11 a 14 g.	Sexo : machos
Guía de remisión : 035651	Destino : Aguilar Quispe, Yon
Chorrillos : 17 de abril del 2018	Cusco
<p>El Médico Veterinario, que suscribe, Arturo Rosales Fernández. Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias * .</p> <p>*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.</p>	
Chorrillos, 17 de abril del 2018 (Fecha de emisión del certificado)	 M.V. Arturo Rosales Fernández, C.M.V.P. 1586
NOTA: El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.	

**ANEXO N° 3: FICHA PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LAS
PRUEBAS DE SOLUBILIDAD**

PRUEBAS DE SOLUBILIDAD		
SOLVENTE	EXTRACTO ETANÓLICO AL 70%	EXTRACTO FLAVONOÍDICO
Agua destilada		
Metanol		
Etanol al 40%		
Etanol al 70%		
Etanol al 90%		
Acetato de etilo		
Acetona		
Cloroformo		
Hexano		

Leyenda:

Muy soluble	+++
Soluble	++
Poco soluble	+
Insoluble	-

**ANEXO N° 4: FICHA PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS DEL ANÁLISIS
FITOQUÍMICO CUALITATIVO**

ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO			
METABOLITOS SECUNDARIOS	REACTIVO	EXTRACTO ETANÓLICO AL 70%	EXTRACTO FLAVONOÍDICO
Alcaloides	Dragendorff		
Azúcares reductores	Fehling		
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico		
Esteroides	Liebermann-Burchard		
Flavonoides	Shinoda		
Glicósidos	Fehling		
Lactonas sesquiterpénicas	Baljet		
Quinonas	H ₂ SO ₄		
Saponinas	Espuma		
Taninos	Gelatina		

Leyenda:

Abundante cantidad	+++
Moderada cantidad	++
Escasa cantidad	+
Negativo	-

ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

Estas pruebas rápidas consisten en la evaluación cualitativa (por cambios de coloración) de la presencia de metabolitos secundarios como son los fenoles, esteroides, alcaloides, flavonoides, saponinas, etc.

ALCALOIDES: Reacción de Dragendorff

Se toma 0.5ml de la solución acida del extracto y agregar 2 a 3 gotas de reactivo de Dragendorff. La formación de un precipitado o coloración roja indica prueba positiva para alcaloides.

AZÚCARES REDUCTORES: Ensayo de Fehling

A 1 o 2ml de extracto diluido agregar 2ml de reactivo, se somete a calentamiento en baño María por 5 a 10 minutos. Si la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado de color rojo indica prueba positiva.

COMPUESTOS FENÓLICOS: Reacción con FeCl_3 (1% en H_2O)

A 0.5 ml de extracto diluido agregar 1 o 2 gotas cloruro férrico al 1 %, la presencia de precipitaciones azuladas o verdosas indican prueba positiva para compuestos fenólicos.

ESTEROIDES – TRITERPENOS: Reacción de Liebermann-Burchard

Se coloca aproximadamente 0.5ml de extracto y se agrega 2 a 3 gotas de reactivo de Liebermann-Burchard. Una coloración azul o verde para esteroides, rojo, rosado o violeta para triterpenos y amarillo pálido para esteroides o triterpenos saturados.

FLAVONOIDES: Reacción de Shinoda

De la dilución ya preparada tomar 0.5ml y agregar limaduras de magnesio metálico más 2 a 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado. La presencia de coloraciones rojizas tendientes al amarillo o azuladas indica prueba positiva.

- Flavonoles: Rojo magenta.
- Glavanona : Rojo magenta , violeta, azul
- Isoflavonas: Amarillo

GLICÓSIDOS: Ensayo de Fehling

A 1 o 2ml de extracto diluido agregar 2ml de reactivo, se somete a calentamiento en baño María por 5 a 10 minutos. Si la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado de color rojo indica prueba positiva.

LACTONAS SESQUITERPÉNICAS: Reacción de Baljet

A 2 o 3ml de extracto diluido agregar 3 o 4 gotas de reactivo, siendo positivas si se forma coloración anaranjada o roja oscura.

QUINONAS: Ácido sulfúrico

A 0.2 ml de la dilución se agrega 0.4 ml de ácido sulfúrico concentrado, las coloraciones rojizas indican prueba positiva.

SAPONINAS: Índice Afrosimétrico o de la Espuma

En un tubo de ensayo se colocan 0.5g de extracto y se le agrega 10 ml de agua. Se agita vigorosamente por 30 segundos y se deja en reposo durante 15 minutos. Se considera positivo si la espuma sobrenadante tiene una altura mayor a 5mm.

TANINOS: Reacción Gelatina (1g) – NaCl (10mg) (100ml H₂O)

A 0.5 ml del extracto se adiciona 3 a 5 gotas de la solución gelatina-sal. La formación de un precipitado indica prueba positiva.

ANEXO N° 5: HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA MEDICIÓN DEL TIEMPO DE CLIMBING, SWIMMING E INMOVILIDAD EN LA PRUEBA DE NADO FORZADO MODIFICADO

Para la medición del tiempo de climbing, swimming e inmovilidad total durante los últimos cinco minutos de la prueba de nado forzado se utiliza la técnica de medición de la conducta predominante en intervalos de 5 segundos siguiendo la descripción de Detke et al., (1995). Las conductas que se midieron fueron las siguientes: **Climbing:** “C”, **Swimming:** “S” e **Inmovilidad:** “I”.

Grupo:	Numero de ratón:	Color:	Código de videograbación:									
MINUTO	SEGUNDOS											
Min 1	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Min 2	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Min 3	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Min 4	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Min 5	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Climbing: C				Swimming: S				Inmovilidad: I				
Tiempo total:				Tiempo total:				Tiempo de total:				

Grupo:	Numero de ratón:	Color:	Código de videograbación:									
MINUTO	SEGUNDOS											
Min 1	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Min 2	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Min 3	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Min 4	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Min 5	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Climbing: C				Swimming: S				Inmovilidad: I				
Tiempo total:				Tiempo total:				Tiempo de total:				

Fuente: Adaptado de DETKE *et al.*, 1995.

ANEXO N° 6: HOJA DE DATOS DE LA RESINA DIAION® HP-20

Product Data Sheet	No.01-10-A-0101
DIAION™ HP20	

DIAION™ HP20 is based on a unique rigid polystyrene/divinylbenzene matrix. A controlled pore size distribution and large surface area offer excellent resolution and the capacity for a wide range of molecules, from small peptides and oligonucleotides up to large proteins.

DIAION™ HP20 is characterized by:

- | | |
|--|--|
| >> Unique pore size distribution | >> High chemical and physical stability |
| >> Excellent batch-to-batch reproducibly | >> Excellent pressure/flow characteristics |
| >> Wide application | |

Physical and chemical properties

		DIAION™ HP20
Grade Name		Spherical, porous
Bead form		Polystyrene/divinylbenzene
Matrix		
Chemical Structure		$ \begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---CH---CH}_2\text{---CH---} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{C}_6\text{H}_5 \qquad \qquad \qquad \text{C}_6\text{H}_5 \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{---CH---CH}_2\text{---} \end{array} $
Shipping Density*	g/L	690
Water content	%	55 - 65
Particle Size Distribution thr. 250 μm	%	10 max.
Effective size	mm	0.25 min.
Uniformity Coefficient	-	1.6 max.
Particle Density*	g/mL	1.01
Specific Surface Area*	m ² /g	590
Pore Volume*	mL/g	1.3
Pore Radius*	Å	290

Note : properties with a mark "*" are referential data.

Swelling ratio in various solvents

Methanol	1.13
Ethanol	1.24
2-Propanol	1.17
Acetone	1.24
Toluene	1.25
Acetonitrile	1.17
Water	1.00



Mitsubishi Chemical Corporation 1-11-2, Osaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141-0032, Japan
 Tel: +81-3-6748-7146 Fax: +81-3-5487-6810 Web: www.diaion.com/en

DIAION™ HP20

Pore size distribution

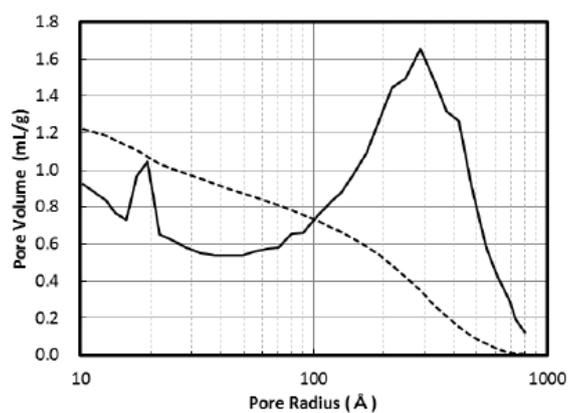


Fig. 1 Pore size distribution of HP20

Recommended Operating Conditions

Maximum Operating Temperature	°C	130
Operating pH Range		0 - 14
Minimum Bed Depth	mm	800
Flow rate	BV/h	Loading 0.5 - 5
	BV/h	Displacement 0.5 - 2
	BV/h	Regeneration 0.5 - 2
	BV/h	Rince 1 - 5
Regenerant		
		Organic solvents for hydrophobic compounds
		Bases for acidic compounds
		Acids for basic compounds
		Buffer solution for pH sensitive compounds
		Water for an ionic solution
		Hot steam for volatile compounds



Mitsubishi Chemical Corporation 1-11-2, Osaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141-0032, Japan
 Tel: +81-3-6748-7146 Fax: +81-3-5487-6810 Web: www.diaion.com/en

DIAION™ HP20**Hydraulic Characteristics**

The approximate pressure drop at various temperatures and flow rates for each meter of bed depth of DIAION™ HP20 resin in normal down flow operation is shown in the graphs below.

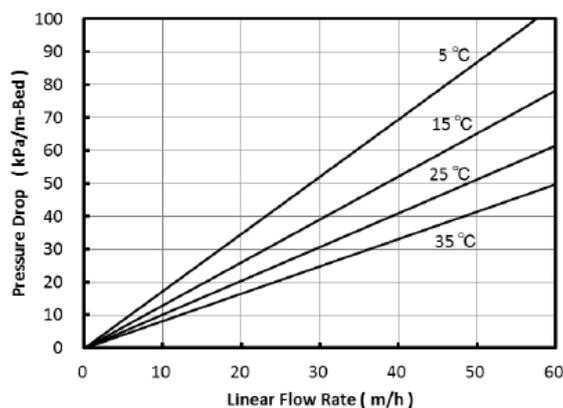


Fig. 2 Pressure Drop of HP20

FDA status

DIAION™ HP20 may be used to process food and beverage products and isolate specialized food additives as intended and such used may be said to fully comply with the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act.

Applications

- Purification of small peptides, oligonucleotides and proteins
- Adsorption of vitamins, antibiotics, enzymes, steroids and other substance from fermentation solutions
- Decolorization of various sugar solutions
- Adsorption of fatty acids
- Removal of phenol
- Adsorption of various perfume
- Decolorization and purification of various chemicals

Notice

This information are given in good faith but without warranty, and this also applies where proprietary rights of third parties are involved. The application, use and processing of our products are beyond our control and therefore your own responsibility.



Mitsubishi Chemical Corporation 1-11-2, Osaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141-0032, Japan
Tel: +81-3-6748-7146 Fax: +81-3-5487-6810 Web: www.diaion.com/en

**ANEXO N° 7: CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE LA RESINA DIAION® HP-20
EMITIDO POR SUPELCO**

Certificate of Analysis

Diaion HP20 Resin

Catalog Number: 13605

Test Date: 01/26/2017

Supelco Lot Number: 101324

Manufacturer Lot Number: 6L502

Analytical data provided by manufacturer

<u>Test</u>	<u>Specification</u>	<u>Results</u>
Water Content	55 - 65 %	59.8 %
Effective Size	≥ 0.25 mm	0.37 mm
Particle Size Distribution through 250 μ m	≤ 10 %	2.1 %
Uniformity Coefficient	≤ 1.6	1.4



Quality Control Supervisor

SUPELCO
Supelco Park · Bellefonte, PA
16823-0048 USA · Phone (814) 359-3441

ANEXO N° 8: PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR Y USAR COLUMNAS DE RESINA DIAION® HP-20 EMITIDO POR SUPELCO

Procedures for Preparing and Using Columns of Amberlite XAD, Diaion, Dowex, MCI GEL, Sepabeads, and Supelite DAX Adsorbent Resins

Precautions: DO NOT use nitric acid or other strong oxidizing agents with these materials. Elution with organic solvents, such as methanol, ethanol, or isopropanol, can cause these resins to swell. Use enough resin to half-fill the column only. This will allow room for expansion when resin-swelling solvents are used.

Resin Wetting Procedure

Most of these materials are supplied in wet form. However, prolonged exposure to air during shipment and/or storage may cause the material to dry. The material must be wetted before use unless the application is air sampling. Follow the procedure outlined here.

1. Transfer the dry resin to a 500mL beaker. Add sufficient methanol to cover the resin bed by 1-2 inches (2.5-5cm).
2. Stir the resin gently for a minute to ensure complete mixing. Allow the material to stand for 15 minutes.
3. Carefully decant most of the methanol and replace it with distilled water. Stir the mixture, then allow it to stand for 5-10 minutes. Follow the column preparation instructions below.

Preparation of Columns

Always use fully hydrated resin when preparing a column. If necessary, wet the material by following the procedure described above, and do not allow the resin bed to dry during preparation or subsequent use. A constant head of about 1" (2.5cm) of water or solvent above the resin bed will prevent resin dehydration and will reduce channeling in the bed.

1. Add approximately 1" (2.5cm) of deionized water to the empty column before you add the resin slurry.
2. Slowly pour the resin slurry into the column. As the column fills, drain excess water through the bottom of the column, but do not allow the liquid level to fall below the top of the resin bed. Add enough resin to half-fill the column only. This will allow room for expansion when resin-swelling solvents are used.

ANEXO N° 9: PROCEDIMIENTO PARA EL USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

SECTOR SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD



N° 102 -2012-J-OPE/INS

RESOLUCIÓN JEFATURAL

Lima, 18 de abril de 2012

VISTO:

El expediente con registro N° 00018637-11, Informe N° 002-2011-CIEA-INS del Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales en Investigación, en relación a la solicitud de aprobación del Procedimiento para el Uso de Animales de Laboratorio en Investigación en el Instituto Nacional de Salud;

CONSIDERANDO:

Que, el Instituto Nacional de Salud es el Organismo Público Ejecutor del Ministerio de Salud, tiene como parte de su misión, la promoción, desarrollo y difusión de la investigación científica-tecnológica y la prestación de servicios de salud en los campos de la salud pública, el control de las enfermedades transmisibles y no transmisibles, la producción de biológicos;

Que, el Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales de Investigación designado por la Resolución Jefatural N° 134-2010-J-OPE/INS, modificado por la Resolución Jefatural N° 188-2011-J-OPE/INS, ha presentado el proyecto del Procedimiento para el Uso de Animales de Laboratorio que tiene por finalidad asegurar que las actividades que impliquen la utilización de animales de laboratorio u otros animales por la entidad, se desarrollen en forma humanitaria y en marco de los principios éticos y normativos y en el marco de la Ley N° 27265, Ley de Protección a los Animales Domésticos y a los Animales Silvestres mantenidos en Cautiverio;

Que, el Instituto Nacional de Salud para cumplir sus funciones formula y aprueba los procedimientos por lo que es necesaria la aprobación del presente Procedimiento del Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales en Investigación del Instituto Nacional de Salud;

Con las visaciones de la Sub Jefatura Oficina General de Investigación y Transferencia Tecnológica, la Oficina General de Asesoría Técnica y la Oficina General de Asesoría Jurídica; y,

De conformidad con lo dispuesto en el literal h) del artículo 12° del Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Salud, aprobado por Decreto Supremo N° 001-2003-SA;



SE RESUELVE:

Artículo 1°.- APROBAR el "Procedimiento para el Uso de los Animales de Laboratorio en el Instituto Nacional de Salud" primera edición, con el código PRA-INS-036, Edición N° 01, que forma parte del anexo.

Artículo 2°.- NOTIFICAR la presente Resolución a la Oficina General de Investigación y Transferencia Tecnológica, Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales de Investigación al Órgano de Control Institucional, a los Centros Nacionales de Salud del Instituto Nacional de Salud.

Regístrese y comuníquese.



VICTOR SUÁREZ MORENO
Jefe (e)
Instituto Nacional de Salud

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CERTIFICO: Que la presente copia fotostática es exactamente igual
al documento que he tenido a la vista que he devuelto al interesado.
Registro N° 513 Lima 01/11/2016
SR. CARLOS A. VELASQUEZ DE VELASCO
Sub-Jefatura

	PROCEDIMIENTO	PRA-INS-036
	PARA EL USO DE ANIMALES DE LABORATORIO EN EL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD	Edición N° 01
		Página 2 de 30

4.8. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. CIOMS, 1985.

5. PRINCIPIOS GENERALES PARA EL CUIDADO ANIMAL

Todas las actividades que utilicen animales para la investigación, diagnóstico, control de calidad y producción de biológicos deberán de tener en cuenta los siguientes principios:

- 5.1. Posibilitar solamente el mínimo de manipulaciones al animal y las intervenciones en su entorno, evitando perturbarlo o provocarle reacciones de alerta, refugio o escape.
- 5.2. Deberá evitarse el dolor o sufrimiento que puede ser experimentado por los animales, o minimizado en la mayor medida posible, con asesoramiento veterinario para el uso de sedación, anestesia apropiada, analgesia y otras medidas aplicables al tipo de animal y estudio.
- 5.3. Aquellos que utilicen o cuiden animales deben ser calificados y competentes para ello, por ambos motivos, por su propia seguridad y por la salud y bienestar de los animales.
- 5.4. Ofrecer al animal un entorno confortable y protegido en cuanto a:
 - a. Agentes físicos: temperatura, humedad, ventilación, ruidos, iluminación y cama.
 - b. Agentes químicos: calidad de aire, ausencia de sustancias químicas o nocivas a su especie, calidad del agua y de los alimentos.
 - c. Agentes biológicos: ausencia de microorganismos patógenos (bacterias, virus, parásitos).
- 5.5. Lograr la seguridad del confinamiento, evitando su escape o fuga, la penetración de otros animales, la exposición a daños y la ausencia de peligros.
- 5.6. Las áreas de alojamiento de los animales deben ser específicas para este propósito y responder a los requerimientos establecidos para la actividad de que se trate.
- 5.7. Se deben lograr los objetivos del ensayo o validación con el mínimo de variables de tiempo y de animales.
- 5.8. En caso necesario, se deberá aplicar la eutanasia a los animales lo más temprano posible, coherente con los objetivos científicos del estudio.

6. CONSIDERACIONES ESPECÍFICAS

Los procedimientos descritos en el presente documento normativo se refieren a:



ANEXO N° 10: ARCHIVO FOTOGRÁFICO



FOTOGRAFÍA N° 1: *Viola tricolor* L. “pensamiento”, en su hábitat natural en la comunidad de Janac Chuquibamba, distrito de Lamay, provincia de Calca, Cusco.
Fuente: Propia.



FOTOGRAFÍA N° 2: Pesado de la especie vegetal en estudio después de estar introducidas en la estufa para la determinación del porcentaje de humedad.
Fuente: Propia.



FOTOGRAFÍA N° 3: Proceso de concentración de las muestras para la obtención de los extractos mediante un rotavapor.
Fuente: Propia.

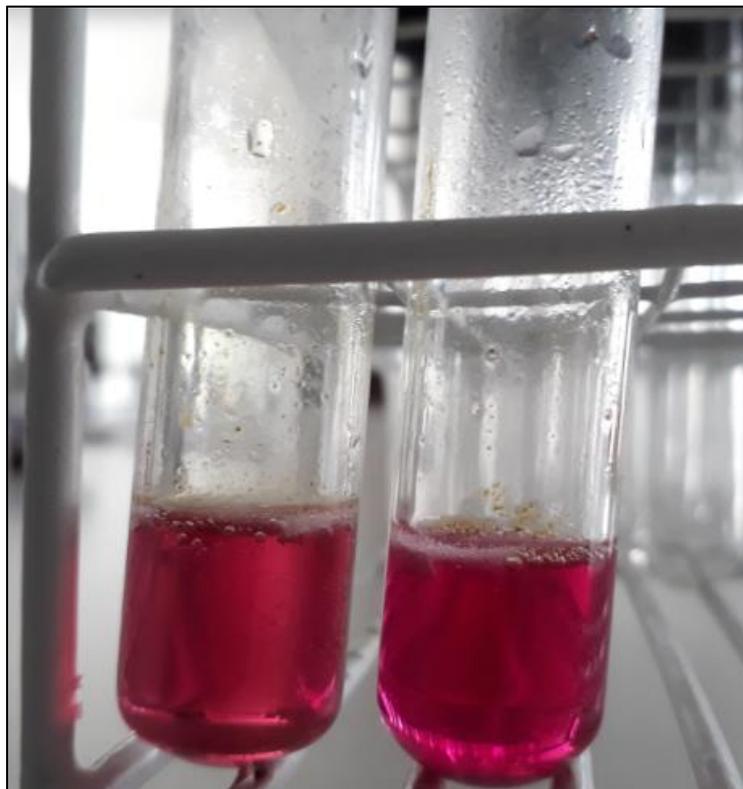


FOTOGRAFÍA N° 4: Prueba de solubilidad realizado a los extractos etanólico y flavonoídico de *Viola tricolor* L. en diferentes solventes
Fuente: Propia.



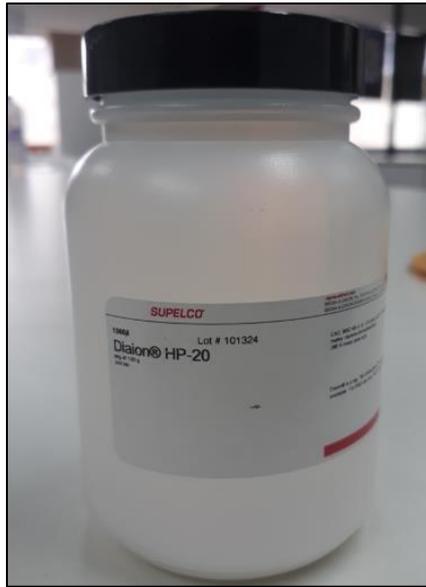
FOTOGRAFÍA N° 5: Reacciones de coloración para la identificación de metabolitos secundarios en el análisis fitoquímico cualitativo.

Fuente: Propia.



FOTOGRAFÍA N° 6: Reacción de Shinoda positivo para identificar flavonoides de los extractos etanólico y flavonoídico de *Viola tricolor* L., respectivamente.

Fuente: Propia.



FOTOGRAFÍA N° 7: Resina Diaion® HP-20 utilizado como fase estacionaria en Cromatografía en Columna
Fuente: Propia.



FOTOGRAFÍA N° 8: Proceso de Cromatografía en Columna realizado al extracto flavonoídico de *Viola tricolor* L.
Fuente: Propia.



FOTOGRAFÍA N° 9: Fracciones flavonoídicas (FR1 – FR7) obtenidas por Cromatografía en Columna.
Fuente: Propia.



FOTOGRAFÍA N° 10: Reacción de Shinoda positivo para identificar flavonoides de las fracciones flavonoídicas de *Viola tricolor* L.
Fuente: Propia.



FOTOGRAFÍA N° 11: Fracciones flavonoídicas concentradas y disueltas en metanol (Blanco) para su identificación por espectroscopía UV/Vis.

Fuente: Propia.



FOTOGRAFÍA N° 12: Análisis en espectrofotómetro de las diferentes fracciones flavonoídicas.

Fuente: Propia.



FOTOGRAFÍA N° 13: Medicamento Prozac® (Fluoxetina) 20 mg utilizado como patrón en la prueba de nado forzado modificado.

Fuente: Propia.



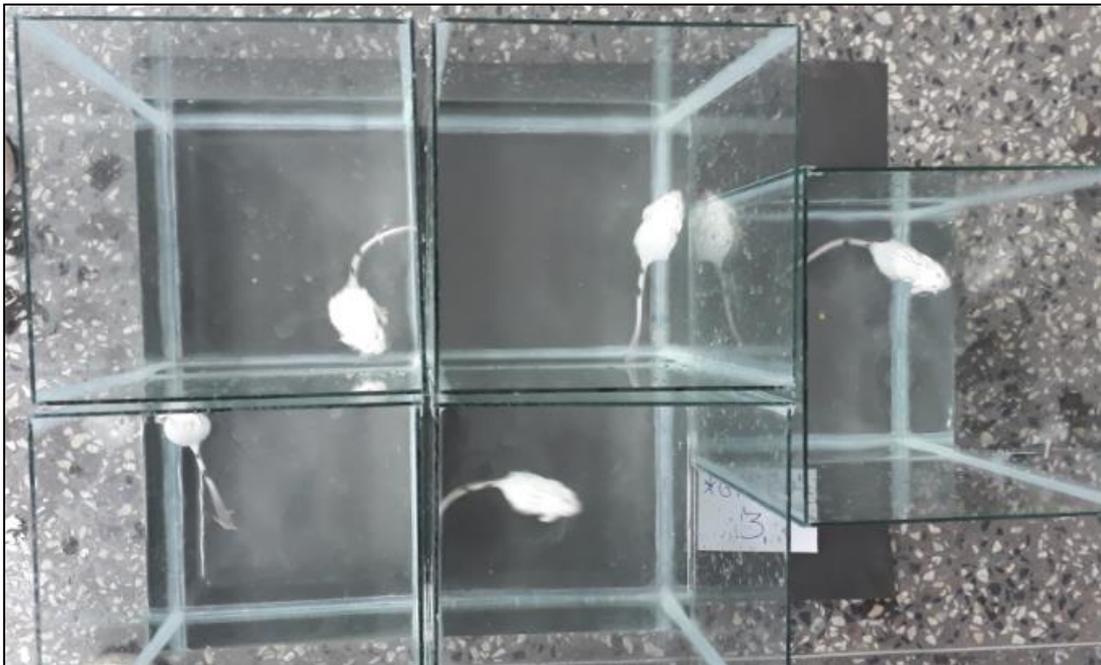
FOTOGRAFÍA N° 14: Administración del tratamiento vía oral a los animales en experimentación, en la prueba de nado forzado modificado.

Fuente: Propia.



FOTOGRAFÍA N° 15: Grupo de animales de experimentación sumergidas en cubetas de vidrio con agua en la prueba piloto de nado forzado.

Fuente: Propia.



FOTOGRAFÍA N° 16: Grupo de animales de experimentación sumergidas en cubetas de vidrio con agua en la prueba de nado forzado modificado.

Fuente: Propia.



FOTOGRAFÍA N° 17: Animales de experimentación secadas con toallas pequeñas después de la prueba de nado forzado modificado.

Fuente: Propia.