

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

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS, MATEMÁTICAS,  
FARMACIA E INFORMÁTICA**

**CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**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 AÉRES EN FLORACIÓN DEL *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium* e *Hypericum silenoides*.**

**TESIS PRESENTADA POR:**

**Br. GARI VIDAL CCANA CCAPATINTA**

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL  
DE QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**ASESORES:**

**M.Sc. CARLA DEL CARPIO JIMÉNEZ**

**M.Sc. CARLOS SERRANO FLÓREZ**

**M.Sc. EMMA JESÚS URRUNAGA SORIA**

**CUSCO - PERÚ  
2011**

**TESIS AUSPICIADA POR EL CONSEJO DE INVESTIGACIÓN DE LA UNSAAC**

## DEDICATORIA

*Al Espíritu Supremo... "All praise and glory be to God, through Him all things are possible"*

*¡El amor más lindo que existe está en todo! Está en las aguas de los océanos, en los ríos y en las cascadas que tanto te gustan. También está en el Cielo, en la Tierra y en el Hombre. ¿Consigues advertirlo en las personas a tu alrededor? ¿Consigues, incluso, percibir que ellas son bastante más de lo que aparentan? ¿Y es en ellas, además de sus cuerpos y de sus identidades psíquicas momentáneas, sus aspectos físicos, culturales, religiosos, psicológicos y humanos, el principio espiritual imperecedero? Cada una de ellas es pura consciencia, aunque revestida temporalmente de entorpecimientos densos. ¿Y ni siquiera ellas tienen plena noción de eso! Sin embargo, ¿consigues ver lo que está dentro de su corazón? Brilla allí la chispa espiritual, imperecedera, dotada del fuego estelar y detonadora de inmenso potencial creativo. En ella vive el amor más lindo que existe... Paz y Luz.*

*A la Pachamama... "La Santa Tierra, generadora de vida, nos cría, nos nutre, nos ofrece calor y abrigo, y hasta en la muerte nos espera de brazos abiertos para unirnos nuevamente con ella"*

*A Vidal... "No es la carne y la sangre, sino el corazón, lo que nos hace padre e hijo".*

*A Elizabeth... "Ninguna lengua es capaz de expresar la fuerza, la belleza y la heroicidad de una madre".*

*A Karen... "Los ojos son el punto donde se mezclan alma y cuerpo."*

<i>Des yeux qui font baisser les miens,</i>	<i>Dont je connais la cause.</i>
<i>Un rire qui se perd sur sa bouche,</i>	<i>C'est lui pour moi, moi pour lui,</i>
<i>Voilà le portrait sans retouche.</i>	<i>Dans la vie,</i>
<i>De l'homme auquel j'appartiens</i>	<i>Il me l'a dit, la jure pour la vie.</i>
	<i>Et des que je laperçois</i>
<i>Quand il me prend dans ses bras</i>	<i>Alors je sens en moi</i>
<i>Il me parle tout bas,</i>	<i>Mon cœur qui bat.</i>
<i>Je vois La Vie En Rose.</i>	
<i>Il me dit des mots d'amour,</i>	<i>Des nuits d'amour a ne plus en finir</i>
<i>Des mots de tous les jours,</i>	<i>Un grand bonheur qui prend sa place</i>
<i>Et ça me fait quelque chose.</i>	<i>Des ennuis des chagrins, des phases</i>
<i>Il est entre dans mon cœur</i>	<i>Heureux, heureux a en mourir.</i>
<i>Une part de bonheur</i>	

*Gari Vidal*

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Gracias por acogerme en sus aulas y hacer que cumpla con esta gran meta.*

*Al Instituto de investigación de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Gracias por su apoyo y colaboración.*

*A los docentes de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica, Gracias por compartir sus conocimientos y experiencias de vida durante toda mi etapa universitaria.*

*A los docentes de la Carrera Profesional de Química, Gracias por enseñarme la esencia de ser "Químico Farmacéutico".*

*A mi estimada asesora la MgS. Carla del Carpio Jiménez, Gracias por brindarme su apoyo, confianza y aliento en los momentos difíciles durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.*

*A mis estimados Profesores de Química MgS. Emma Jesús Urrunaga Soria y MgS. Carlos Serrano Flores por abrirme los ojos y mostrarme nuevos horizontes en el mundo de las Ciencias Farmacéuticas.*

*A la Dra. Gilsane Lino von Roser, del Laboratorio de Farmacognosia de la Universidad Federal de Rio grande del Sur, Porto Alegre - Brasil, Gracias por su estima y apoyo incondicional al abrirme las puertas del grupo de investigación en Hypericum de la facultad de Farmacia de la UFRGS.*

*A la Dra. Sara Linne Prockett, del Departamento de Farmacognosia del Instituto de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Karl-Franzens, Graz - Austria, Gracias por su apoyo incondicional en el desarrollo de los análisis por HPLC y RMN.*

*Finalmente, mas no con menor reconocimiento, agradecer infinitamente a cada una de las personas que intervinieron en la formulación y ejecución del presente trabajo, Gracias por el tiempo que me regalaron, y por compartir sus experiencias y conocimientos.*

## CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE ABREVIACIONES	xi
RESUMEN	xii
SUMMARY	xiii
INTRODUCCIÓN	xiv
<b>CAPÍTULO I: GENERALIDADES</b>	<b>1</b>
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	4
1.3 OBJETIVO GENERAL	4
1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
1.5 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA	6
1.6 HIPÓTESIS	6
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO-CONCEPTUAL</b>	<b>7</b>
2.1 VISIÓN HISTÓRICA	8
2.2 ESTADO DE LA INVESTIGACIÓN	9
2.3 ANTECEDENTES	9
2.3.1 ANTECEDENTES BOTÁNICOS	9
2.3.1A LA SUBFAMILIA <i>Hypericoideae</i>	9
2.3.1B EL GÉNERO <i>Hypericum</i>	9
2.3.1C LAS SECCIONES <i>Brathys</i> y <i>Trigynobrathys</i>	10
2.3.1D <i>Hypericum andinum</i> Gleason (sección <i>Brathys</i> )	11
2.3.1E <i>Hypericum laricifolium</i> Juss (sección <i>Brathys</i> )	12
2.3.1F <i>Hypericum brevistylum</i> Choisy (sección <i>Trigynobrathys</i> )	13
2.3.1G <i>Hypericum silenoides</i> Juss (sección <i>Trigynobrathys</i> )	14
2.3.2 ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS	16
2.3.2A NAFTODIANTRONAS EN EL GÉNERO <i>Hypericum</i>	16
2.3.2B FLOROGLUCINOLES EN EL GÉNERO <i>Hypericum</i>	17
2.3.2C FLAVONOIDES EN EL GÉNERO <i>Hypericum</i>	23
2.3.2D XANTONAS EN EL GÉNERO <i>Hypericum</i>	24
2.3.2E ÁCIDOS FENÓLICOS EN EL GÉNERO <i>Hypericum</i>	26
2.3.2F ACEITES ESENCIALES EN EL GÉNERO <i>Hypericum</i>	26
2.3.3 ANTECEDENTES FARMACOLÓGICOS Y TOXICOLÓGICOS	27

2.3.3A	INVESTIGACIONES PRECLÍNICAS “ <i>in vitro</i> ” DEL <i>Hypericum perforatum</i> -----	27
2.3.3B	INVESTIGACIONES PRECLÍNICAS “ <i>in vivo</i> ” DEL <i>Hypericum perforatum</i> : FRACCIONES Y METABOLITOS ACTIVOS-----	28
2.3.3C	INVESTIGACIONES CLÍNICAS Y TOXICOLÓGICAS DEL <i>Hypericum perforatum</i> -----	32
2.3.3D	INVESTIGACIONES PRECLÍNICAS DE OTRAS ESPECIES DE <i>Hypericum</i> CON ACTIVIDAD DE TIPO ANTIDEPRESIVO-----	33
2.4	BASES TEÓRICO-CIENTÍFICAS-----	38
2.4.1	DEPRESIÓN MENTAL Y ANTIDEPRESIVOS-----	38
2.4.1A	EL DESCUBRIMIENTO DE LOS ANTIDEPRESIVOS-----	38
2.4.1B	LA HIPÓTESIS MONOAMINÉRGICA DE LA DEPRESIÓN-----	39
2.4.1C	OTRAS HIPÓTESIS-----	40
2.4.1D	TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS ACTUALES DE LA DEPRESIÓN-----	41
2.4.2	MODELOS ANIMALES DE DEPRESIÓN-----	44
2.4.2A	MODELOS FARMACOLÓGICOS DE DEPRESIÓN-----	44
2.4.2B	MODELOS CONDUCTUALES: ESTRÉS DE INFANCIA TEMPRANA-----	46
2.4.2C	MODELOS CONDUCTUALES: LA INDEFENSIÓN APRENDIDA-----	47
2.4.2C	MODELOS CONDUCTUALES: LA PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA-----	48
2.4.3	TOXICIDAD AGUDA-----	50
2.4.3A	LA DL <sub>50</sub> COMO CONSTANTE BIOLÓGICA-----	51
2.4.3B	EL DESARROLLO HISTÓRICO DE LOS TEST DE DL <sub>50</sub> -----	52
2.4.3C	EL MÉTODO DE LORKE PARA LA DETERMINACIÓN DE DL <sub>50</sub> -----	53
2.4.3D	TEST DE IRWIN-----	55
<b>CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS-----</b>		<b>56</b>
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO-----	57
3.1.1	MUESTRA VEGETAL-----	57
3.1.1A	CRITERIOS DE INCLUSIÓN-----	57
3.1.1B	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN-----	58
3.1.2	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN-----	58
3.1.2A	CRITERIOS DE INCLUSIÓN-----	58
3.1.2B	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN-----	58
3.2	MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO-----	58
3.2.1	MATERIALES DE CAMPO-----	58

3.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO-----	58
3.2.3 INSTRUMENTOS DE LABORATORIO-----	58
3.2.4 SOLVENTES-----	59
3.2.5 OTROS MATERIALES-----	59
3.3 DISEÑO METODOLÓGICO-----	59
3.3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN-----	59
3.3.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN-----	59
3.3.3 VARIABLES: DEFINICIÓN CONCEPTUAL Y OPERACIONAL-----	59
3.3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS-----	62
3.3.5 TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS-----	63
3.4 PROCEDIMIENTOS-----	63
3.4.1 ANÁLISIS FITOQUÍMICO-----	64
3.4.1A PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS-----	64
3.4.1B ANÁLISIS CUALITATIVO DE METABOLITOS POR TLC-----	64
3.4.1C ANÁLISIS CUALITATIVO DE METABOLITOS POR HPLC-----	66
3.4.1D AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE FLOROGLUCINOLES-----	67
3.4.2 ANÁLISIS TOXICOLÓGICO-----	70
3.4.2A DETERMINACIÓN DE LA DL <sub>50</sub> -----	70
3.4.2B DETERMINACIÓN DEL PERFIL PSICOFARMACOLÓGICO-----	70
3.4.3 ANÁLISIS FARMACOLÓGICO-----	70
3.4.3A EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FLUOXETINA-----	70
3.4.3B PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA EN RATONES-----	71
3.4.3C CURVA DOSIS RESPUESTA DE FLUOXETINA-----	72
3.4.3D CURVA DOSIS RESPUESTA DE LOS EXTRACTOS DE <i>Hypericum</i> -----	72
RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	73
CONCLUSIONES-----	101
RECOMENDACIONES-----	104
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	106
ANEXOS-----	116

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA N°1. Distribución mundial del género <i>Hypericum</i> -----	10
FIGURA N°2. Distribución del <i>Hypericum andinum</i> -----	11
FIGURA N°3. Distribución del <i>Hypericum laricifolium</i> -----	13
FIGURA N°4. Representación del <i>Hypericum laricifolium</i> -----	13
FIGURA N°5. Distribución del <i>Hypericum brevistylum</i> -----	14
FIGURA N°6. Representación del <i>Hypericum brevistylum</i> -----	14
FIGURA N°7. Distribución del <i>Hypericum silenoides</i> -----	15
FIGURA N°8. Representación del <i>Hypericum silenoides</i> -----	15
FIGURA N°9. Naftodiantronas del género <i>Hypericum</i> -----	17
FIGURA N°10. Glándulas negras en el <i>Hypericum perforatum</i> -----	17
FIGURA N°11. Floroglucinoses del <i>Hypericum perforatum</i> -----	18
FIGURA N°12. Glándulas negras y translucidas del <i>Hypericum perforatum</i> -----	18
FIGURA N°13. Estructura básica de los floroglucinoses derivados del ácido filicínico---	19
FIGURA N°14. Flavonoides del <i>Hypericum perforatum</i> -----	24
FIGURA N°15. Curva dosis-respuesta del extracto LI160 en la prueba de natación forzada-----	29
FIGURA N°16. Curva dosis-respuesta de la hipericina en la prueba de natación forzada- -----	30
FIGURA N°17. Curva dosis-respuesta del hiperósido en la prueba de natación forzada-- -----	31
FIGURA N°18. Curva dosis-respuesta de la hiperforina en la prueba de natación forzada-----	32
FIGURA N°19. Curvas de contenido de 5-HT (mg/g) en cerebro de conejo-----	45
FIGURA N°20. Paradigma de separación materna en primates-----	46
FIGURA N°21. Caja de salto utilizado en los experimentos de Seligman-----	47
FIGURA N°22. Prueba de natación forzada en ratas, modelo final de Porsolt-----	49
FIGURA N°23. Curva dosis respuesta de imipramina y desipramina-----	50
FIGURA N°24. Flujograma de la investigación-----	63
FIGURA N°25. Definición gráfica del factor de retención ( $R_f$ )-----	66
FIGURA N°26. Conducta cromatográfica por HPLC de los metabolitos del <i>Hypericum</i> <i>perforatum</i> -----	67
FIGURA N°27. Cromatograma del análisis cualitativo por TLC de los metabolitos presentes en los extractos etanólicos del <i>Hypericum brevistylum</i> , <i>Hypericum</i> <i>silenoides</i> , <i>Hypericum andinum</i> e <i>Hypericum struthiolifolium</i> -----	75

FIGURA N°28. Curva dosis-respuesta de la fluoxetina clorhidrato administrado v.o. en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la prueba de natación forzada-----	90
FIGURA N°29. Curva dosis-respuesta del extracto seco etanólico del <i>Hypericum laricifolium</i> administrado v.o. en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la prueba de natación forzada-----	92
FIGURA N°30. Curva dosis-respuesta del extracto seco etanólico del <i>Hypericum andinum</i> administrado v.o. en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la prueba de natación forzada-----	93
FIGURA N°31. Curva dosis-respuesta del extracto seco etanólico del <i>Hypericum brevistylum</i> administrado v.o. en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la prueba de natación forzada-----	94
FIGURA N°32. Curva dosis-respuesta del extracto seco etanólico del <i>Hypericum silenoides</i> administrado v.o. en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la prueba de natación forzada-----	95

### LISTA DE TABLAS

TABLA N°1. Floroglucinoles diméricos aislados de especies de <i>Hypericum</i> de las secciones <i>Brathys</i> y <i>Trigynobrathys</i> -----	19
TABLA N°2. Compuestos fenólicos presentes en especies del género <i>Hypericum</i> de las secciones <i>Brathys</i> y <i>Trigynobrathys</i> -----	24
TABLA N°3. Criterios diagnósticos para la depresión mayor según el DSM-IV-----	42
TABLA N°4. Tratamiento antidepresivos actualmente disponibles-----	43
TABLA N°5. Valores de DL <sub>50</sub> de cinco compuestos estudiados por Hunter y Lingk-----	51
TABLA N°6. Tabla para determinar las nuevas dosis en el segundo test de Lorke-----	54
TABLA N°7. Grados de toxicidad de una sustancia según valores de DL <sub>50</sub> .-----	54
TABLA N°8. Determinación de la DL <sub>50</sub> del KCN en ratas según el método de Lorke---	55
TABLA N°9. Procedimientos para el aislamiento e identificación del floroglucinol mayoritario a partir de un extracto supercrítico de las partes aéreas en floración del <i>Hypericum andinum</i> -----	68
TABLA N°10. Procedimientos para el aislamiento e identificación de floroglucinoles mayoritarios a partir de un extracto supercrítico de las partes aéreas en floración del <i>Hypericum brevistylum</i> -----	68
TABLA N°11. Procedimientos para el aislamiento e identificación de floroglucinoles mayoritarios a partir de un extracto supercrítico de las partes aéreas en floración del <i>Hypericum laricifolium</i> -----	69

TABLA N°12. Procedimientos para el aislamiento e identificación del floroglucinol mayoritario a partir de un extracto supercrítico de las partes aéreas en floración del <i>Hypericum silenoides</i> -----	69
TABLA N° 13. Resultados de los porcentajes de rendimiento de los extractos secos obtenidos por maceración por diez días con etanol al 96 % (Razón planta solvente 1:10)-----	74
TABLA N°14. Resultados del análisis cualitativo por TLC de los metabolitos presentes en los extractos etanólicos del <i>Hypericum andinum</i> , <i>Hypericum brevistylum</i> , <i>Hypericum laricifolium</i> , <i>Hypericum silenoides</i> e <i>Hypericum struthiolifolium</i> ----	75
TABLA N°15. Cromatograma y espectros UV-VIS seleccionados obtenidos por HPLC-DAD de los metabolitos principales en el cromatograma del extracto seco etanólico del <i>Hypericum andinum</i> -----	77
TABLA N°16. Cromatograma y espectros UV-VIS seleccionados obtenidos por HPLC-DAD de los metabolitos principales en el cromatograma del extracto seco etanólico <i>Hypericum brevistylum</i> -----	78
TABLA N°17. Cromatograma y espectros UV- seleccionados obtenidos por HPLC-DAD de los metabolitos principales en el cromatograma del extracto seco etanólico <i>Hypericum laricifolium</i> -----	79
TABLA N°18. Cromatograma y espectros UV-VIS seleccionados obtenidos por HPLC-DAD de los metabolitos principales en el cromatograma del extracto seco etanólico <i>Hypericum silenoides</i> -----	80
TABLA N°19. Datos espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup> H del compuesto HAF3456(1) aislado del <i>Hypericum andinum</i> -----	82
TABLA N°20. Datos espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup> H del compuesto HBF5 aislado del <i>Hypericum brevistylum</i> -----	83
TABLA N°21. Datos espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup> H del compuesto HLF7 aislado del <i>Hypericum laricifolium</i> -----	83
TABLA N°22. Datos espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup> H del compuesto HSF6 aislado del <i>Hypericum brevistylum</i> -----	84
TABLA N°23. Determinación de la DL <sub>50</sub> del extracto seco etanólico del <i>Hypericum andinum</i> administrado agudamente v.o., en ratones Balb/c/CNPB-----	86
TABLA N°24. Determinación de la DL <sub>50</sub> del extracto seco etanólico del <i>Hypericum brevistylum</i> administrado agudamente v.o., en ratones Balb/c/CNPB-----	86
TABLA N°25. Determinación de la DL <sub>50</sub> del extracto seco etanólico del <i>Hypericum laricifolium</i> administrado agudamente v.o., en ratones Balb/c/CNPB-----	86
TABLA N°26. Determinación de la DL <sub>50</sub> del extracto seco etanólico del <i>Hypericum silenoides</i> administrado agudamente v.o., en ratones Balb/c/CNPB-----	87

**TABLA N°27.** Principales signos de neurotoxicidad observados tras la administración del extracto seco etanólico del *Hypericum brevistylum* (5000 mg/kg, v.o.) en un ratón Balb/c/CNPB-----88

**TABLA N°28.** Espectro IR, rendimiento y pureza de la fluoxetina clorhidrato aislada a partir de capsulas comerciales fluoxetina clorhidrato de 20 mg-----89

**TABLA N°29.** Curva dosis-respuesta de la fluoxetina clorhidrato administrado v.o. en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la prueba de natación forzada-----90

**TABLA N°30.** Curva dosis-respuesta del extracto seco etanólico del *Hypericum laricifolium* administrado v.o. en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la prueba de natación forzada.-----92

**TABLA N°31.** Curva dosis-respuesta del extracto seco etanólico del *Hypericum andinum* administrado v.o. en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la prueba de natación forzada-----93

**TABLA N°32.** Curva dosis-respuesta del extracto seco etanólico del *Hypericum brevistylum* administrado v.o. en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la prueba de natación forzada-----94

**TABLA N°33.** Curva dosis-respuesta del extracto seco etanólico del *Hypericum silenoides* administrado v.o. en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la prueba de natación forzada-----95

## LISTA DE ABREVIACIONES

<b>AAP:</b>	Asociación americana de psiquiatría
<b>BDNF:</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro.
<b>CRF:</b>	factor liberador de corticotropina
<b>CREB:</b>	Cyclic adenosine monophosphate response element binding protein
<b>DL<sub>50</sub>:</b>	Dosis letal media.
<b>DP:</b>	Dopamina.
<b>HPA:</b>	Eje o axis hipotalámico-hipofisario-adrenal.
<b>HPLC:</b>	Cromatografía líquida de alta presión.
<b>5-HT:</b>	Serotonina.
<b>IMAO:</b>	Inhibidor de la monoaminoxidasa.
<b>IRN:</b>	Inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina.
<b>IRSN:</b>	Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina y noradrenalina.
<b>ISRS:</b>	Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina.
<b>i.p.:</b>	Vía intraperitoneal.
<b>MAO:</b>	Monoaminoxidasa.
<b>NA:</b>	Noradrenalina.
<b>OMS:</b>	Organización mundial de la salud.
<b>PNF:</b>	Prueba de natación forzada.
<b>R<sub>f</sub>:</b>	Factor de retención.
<b>SNC:</b>	Sistema nervioso central.
<b>TLC:</b>	Cromatografía de capa fina.
<b>v.o.:</b>	Vía oral.

## RESUMEN

Las especies de la familia *Clusiaceae*, en especial del género *Hypericum*, han demostrado ser una fuente prolija de metabolitos con propiedades biológicas relevantes. Debido a que el desarrollo de nuevas drogas antidepresivas es un área de constante interés, y el género *Hypericum* ofrece fuente prolija de moléculas bioactivas, se planteó la presente investigación con el objetivo principal de realizar un cribado de actividad de tipo antidepresivo de los extractos secos etanólicos obtenidos de las partes aéreas en floración del *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. Se planteó un estudio experimental, mediante un diseño con postprueba únicamente, dosis única y grupo de control. Se determinó un 35.64, 28.30, 24.60 y 23.14% de porcentaje 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 DL<sub>50</sub> de los extractos fueron mayores a 5000 mg/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 30 mg/kg. Los extractos del *H. andinum* a las dosis de 250 y 500 mg/kg, *H. brevistylum* a la dosis de 250 mg/kg, e *H. silenoides* a la dosis de 500 mg/kg redujeron significativamente el tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada y presentaron efectos estadísticamente comparables al grupo control positivo que recibió fluoxetina a la dosis de 30 mg/kg. 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 al ser administrados por vía oral en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la prueba de natación forzada.

**Palabras clave:** *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium*, *Hypericum silenoides*, familia *Clusiaceae*, prueba de natación forzada, antidepresivo, fluoxetina.

## SUMMARY

The species from the *Clusiaceae* family, especially *Hypericum* genus, have shown to be a good source of secondary metabolites with relevant biological properties. Since the development of new antidepressant drugs is an area of great interest the present investigation was carried out with the principal objective of carrying out a screening of antidepressant-like activity of the ethanol extracts from the aerial parts of *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium* and *H. silenoides*, administered by gavage in Balb/c/CNPB mice submitted to the forced swimming test. It was determined a 35.64, 28.30, 24.60 and 23.14% of yield from the ethanol extracts obtained by maceration of the aerial parts in blossom of *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium* and *H. silenoides*, respectively. It was shown the presence of flavonoids, xanthenes, chlorogenic acid and phloroglucinol derivatives in the extracts obtained. The  $DL_{50}$  values from the extracts were more than 5000 mg/kg. Fluoxetine chlorhydrate was isolated from commercial capsules with a yield of 63% and a purity of 93%. It was determined a maximal reduction of immobility time in the forced swimming test at the doses of 30 mg/kg. The extract of *H. andinum* at the doses of 250 y 500 mg/kg, *H. brevistylum* at the doses of 250 mg/kg and *H. silenoides* at the doses of 500 mg/kg reduced significantly the immobility time in the forced swimming test and their effect were statistically comparable to the positive control group that received fluoxetine 30 mg/kg. The dry ethanol extracts obtained from the aerial parts in blossom from the *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium* and *H. silenoides* shown antidepressant-like activity administered by oral route in Balb/c/CNPB mice submitted to the forced swimming test.

**Key words:** *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium*, *Hypericum silenoides*, *Clusiaceae* family, forced swimming test, antidepressant, and fluoxetine.

## INTRODUCCIÓN

La depresión, es hoy en día una de las primeras causas de discapacidad laboral. Entre los criterios incluidos en las guías diagnósticas de la AAP y de la OMS para la depresión mayor se encuentran: ánimo depresivo, disminución del placer, cambios en el apetito y en el peso, alteraciones del sueño e intentos de muerte y suicidio (BERTON y NESTLER, 2006).

Se calcula que el 15% de los pacientes con trastorno afectivo grave acaban consumando el suicidio. Por ello, y por el importante deterioro que la enfermedad causa en la vida de estos pacientes, es necesario instaurar un tratamiento eficaz (WONG y LICINO *et al.*, 2001).

Entre los antidepresivos destacan la aparición del primer antidepresivo, la iproniazida, un inhibidor de la enzima MAO en 1957, y los resultados satisfactorios con antidepresivos heterocíclicos, en especial la imipramina, en ese mismo año. Años más tarde, en 1980, aparecen los ISRS, con claras ventajas en seguridad y tolerancia con respecto a los anteriores (LÓPEZ-MUÑOZ y ALAMO, 2009).

Sin embargo, las reacciones adversas presentadas por muchos de estos medicamentos limitan su uso, conduciendo en muchos casos a la discontinuación y abandono del tratamiento (NASH y NUTT, 2004; NASH y NUTT, 2007).

En éste contexto, el reino vegetal nos ofrece a las especies del género *Hypericum* como agentes terapéuticos naturales para el tratamiento de la depresión. Muchas especies del género *Hypericum* tienen a la fecha estudios preclínicos y clínicos, y han mostrado un gran potencial como agentes antidepresivos de origen natural (KASPER, 2005; VIANA *et al.*, 2006; SÁNCHEZ-MATEO *et al.*, 2009).

En el presente estudio se realizó un cribado de actividad de tipo antidepresivo de los extractos secos etanólicos de algunas especies del género *Hypericum* del Perú avizorando hallar fuentes alternativas de potenciales drogas antidepresivas de origen natural.

# **CAPÍTULO I**

# **GENERALIDADES**

## 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La depresión mental es una enfermedad seria de la sociedad actual. Su prevalencia se estima entre el 3 y el 5% y que, a lo largo de la vida, puede afectar entre un 10 y 20% de la población adulta. En la depresión predominan una serie de síntomas, como pérdida de interés por las actividades usuales, fatiga, sentimientos de inutilidad, falta de concentración, deseos de muerte, pérdida de apetito o de peso, insomnio, agitación o retraso psicomotor, etc. Se estima que, para el año 2020, la depresión mayor será la segunda causa de discapacidad en el mundo (MICHAUD *et al.*, 2001; WONG y LICINO *et al.*, 2001).

Para el tratamiento de los distintos tipos de depresión existe una amplia gama de fármacos desarrollados a partir de los años cincuenta. En esta década se puso de manifiesto que la iproniazida, fármaco utilizado inicialmente como tuberculostático, inhibía a la enzima MAO y así elevaba el estado de ánimo de los pacientes tuberculosos (BONNET, 2002). Poco después se encontró, también de manera accidental, que la imipramina, inicialmente desarrollado como neuroléptico, exhibía actividad antidepressiva, mediada por el bloqueo de la recaptación de serotonina y noradrenalina a nivel de la hendidura sináptica. Posteriormente se han ido desarrollando nuevos compuestos con actividad antidepressiva que bloquean, de modo más o menos selectivo, la recaptación de alguna de las aminas biogénicas a nivel de la hendidura sináptica de las neuronas del sistema nervioso central (LÓPEZ-MUÑOZ y ALAMO, 2009).

El uso de los antidepressivos ha tenido un crecimiento exponencial en las últimas dos décadas, en especial los ISRS, siendo la fluoxetina uno de los más utilizados debido a la menor incidencia de reacciones adversas y a su relativa seguridad en casos de sobredosificaciones. Aun así los ISRS y la fluoxetina presentan importantes reacciones adversas como anorexia, intolerancia gastrointestinal, trastornos en la eyaculación, etc., los cuales limitan su aceptación y favorecen la discontinuidad del tratamiento (NASH y NUTT, 2007).

En éste contexto surge el *Hypericum perforatum*, un arbusto con atractivas flores amarillas, cuyas propiedades medicinales y preparados derivados de él se conocen desde hace más de 2000 años, en especial por sus propiedad antiinflamatoria, vulneraria y reguladora del sistema digestivo; pero cuyo uso específico en el tratamiento de la depresión y los preparados

derivados de él surgen hace no más de 20 años (MÜLLER, 2005). Los extractos estandarizados obtenidos de esta planta son usados en Europa, E.E.U.U., como también en Sudamérica (VIANA *et al.*, 2006). Una cantidad sustancial de datos experimentales y clínicos respaldan sus propiedades antidepresivas. Su uso está justificado en el tratamiento de la depresión leve a moderada, que es ventajoso frente al tratamiento convencional con imipramina o fluoxetina, esto debido a que el presenta un perfil favorable de reacciones adversas (KASPER, 2005; KASPER *et al.*, 2010).

Muchas otras especies del mismo género son utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de la depresión. El *H. canariense*, *H. glandulosum*, *H. grandifolium* e *H. reflexum*, son algunas de muchas otras especies europeas utilizadas tradicionalmente en el tratamiento de la depresión (SÁNCHEZ-MATEO *et al.*, 2002; SÁNCHEZ-MATEO *et al.*, 2005; SÁNCHEZ-MATEO *et al.*, 2007; SÁNCHEZ-MATEO *et al.*, 2009).

El género *Hypericum* (Clusiaceae), agrupa a un gran número de plantas herbáceas o arbustivas, los cuales están ampliamente distribuidos en las regiones templadas de todos los continentes del mundo. Éste género comprende aproximadamente 450 especies (ROBSON, 1977; CROCKETT *et al.*, 2005; CROCKETT *et al.*, 2010). La investigación química y farmacológica realizada en este género ha conducido al aislamiento de más de 100 compuestos de alrededor de 20 especies, con varias actividades biológicas, los cuales presentan principalmente propiedades antivirales, bactericidas y antidepresivas (VIANA *et al.*, 2005; VIANA *et al.*, 2006).

Debido a que la composición química y farmacológica de las especies del género *Hypericum* son comparables, el estudio de éste género podría ser muy útil en la búsqueda de fuentes alternativas de moléculas antidepresivas y en la identificación de drogas con mecanismos de acción innovadores (VIANA *et al.*, 2006). En base a este criterio chimiotaxonómico se han conducido investigaciones para determinar la potencial actividad antidepresiva en los extractos y fracciones de varias especies del género *Hypericum* de la sección *Trigynobrathys*, las cuales no son utilizadas tradicionalmente en el tratamiento de desordenes afectivos ni depresivos. Hasta la fecha se han evaluado extractos y fracciones del *H. brasiliense*, *H. caprifoliatum*, *H. myrianthum*, *H. connatum*, *H. cordatum*, *H. piriiai*, e *H. polyanthemum* (DAUDT *et al.*, 2000;

GNERRE *et al.*, 2001; MENDES *et al.*, 2002), de los cuales el *H. caprifoliatum* mostró actividad significativa (VIANA *et al.*, 2006) y recientemente el *H. polyanthemum* (STEIN *et al.*, 2010). A pesar de que estudios iniciales mostraron la inactividad del *H. brasiliense* en modelos animales de depresión, se ha demostrado la actividad de un extracto estandarizado (PERAZZO *et al.*, 2008).

## 1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

¿Presentarán los extractos secos etanólicos obtenidos de las partes aéreas en floración del *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium* e *Hypericum silenoides*, administrados por vía oral, actividad de tipo antidepresivo en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la prueba de natación forzada?

¿Presentarán los extractos secos etanólicos obtenidos de las partes aéreas en floración del *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium* e *Hypericum silenoides*, administrados por vía oral, efectos tóxicos agudos en ratones Balb/c/CNPB?

## 1.3 OBJETIVOS GENERALES

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

Determinar los valores de DL<sub>50</sub> de los extractos secos etanólicos obtenidos de las partes aéreas en floración del *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium* e *Hypericum silenoides*, administrados por vía oral en ratones Balb/c/CNPB.

## 1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obtener extractos secos etanólicos de las partes aéreas en floración del *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium* e *Hypericum silenoides*, y determinar sus porcentajes de rendimiento.

Realizar un análisis cualitativo de hipericinas, flavonoides y ácidos fenólicos por TLC en los extractos fluidos etanólicos de las partes aéreas en floración del *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum silenoides* e *Hypericum laricifolium*.

Aislar por cromatografía en columna y TLC preparativa, e identificar por métodos espectroscópicos los floroglucinoses mayoritarios presentes en las partes aéreas en floración del *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium* e *Hypericum silenoides*.

Obtener un perfil cromatográfico preliminar por HPLC de los extractos secos etanólicos de las partes aéreas en floración del *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium* e *Hypericum silenoides*.

Determinar los valores de DL<sub>50</sub> de los extractos secos etanólicos de las partes aéreas en floración del *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium* e *Hypericum silenoides* administrados por vía oral en ratones Balb/c/CNPB.

Determinar el perfil psicofarmacológico preliminar de los extractos secos etanólicos de las partes aéreas en floración del *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium* e *Hypericum silenoides* administrados por vía oral en ratones Balb/c/CNPB.

Extraer, purificar e identificar fluoxetina clorhidrato a partir de capsulas comerciales.

Realizar curvas dosis-respuesta de fluoxetina clorhidrato administrada administrados por vía oral en ratones Balb/c/CNPB en la prueba de natación forzada.

Realizar curvas dosis-respuesta de los extractos secos etanólicos de algunas especies del *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium* e *Hypericum silenoides* administrados por vía oral en ratones Balb/c/CNPB en la prueba de natación forzada.

## 1.5 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

La depresión mental constituye un problema vigente de salud. Así el desarrollo de nuevas drogas antidepresivas, en especial las de origen natural, es un área de constante interés. Muchas especies del género *Hypericum* tienen a la fecha estudios preclínicos y clínicos, y han mostrado un gran potencial como agentes antidepresivos. Son muchas las especies sudamericanas del género *Hypericum*, teniendo dentro de la flora nativa peruana al *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium* e *Hypericum silenoides* las cuales no son utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de la depresión, sin embargo podrían constituir fuentes alternativas de drogas antidepresivas.

## 1.6 HIPÓTESIS

Los extractos secos etanólicos obtenidos de las partes aéreas en floración del *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium* e *Hypericum silenoides*, presentan actividad de tipo antidepresivo al ser administrados por vía oral en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la prueba de natación forzada.

Los extractos secos etanólicos obtenidos de las partes aéreas en floración del *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium* e *Hypericum silenoides*, ocasionan efectos tóxicos al ser administrados por vía oral en ratones Balb/c/CNPB.

**CAPÍTULO II**  
**MARCO TEÓRICO-**  
**CONCEPTUAL**

## 2.1 VISIÓN HISTÓRICA

Las ventajas y propiedades terapéuticas de las especies del género *Hypericum*, en especial del *H. perforatum*, y los preparados derivados de él, se conocen desde hace más de 2000 años. Sin embargo, el uso específico de ésta planta para tratar problemas depresivos es relativamente reciente y se ha hecho importante sólo en los últimos 20 años. El *H. perforatum* fue conocido desde los tiempos del imperio romano y sus semillas eran recomendadas para detener las diarreas y promover la orina; de manera interesante esta planta no era utilizada para tratar la depresión, a pesar de que dicha condición ya era conocida en ese tiempo. Alrededor del mismo tiempo, Dioscórides, un médico de la armada romana nacido en Grecia, recomendaba beber preparados alcohólico del *H. perforatum* junto con líquidos especiales para expulsar los denominados “excrementos coléricos” (MÜLLER, 2005).

Mil años más tarde el famoso médico alemán Paracelso fue uno de los primeros en mencionar al *H. perforatum* como un remedio para tratar alteraciones mentales como la psicosis. Ángelo Sala, Inspirado en Paracelso, probablemente fue el primero en recomendar de manera específica al *H. perforatum* para el tratamiento de la depresión. Cerca de 200 años más tarde, el poeta y médico alemán Justinus Kerner también mencionó al *H. perforatum* como un remedio para el tratamiento de la melancolía. En la historia antigua del *H. perforatum* cabe mencionar también al médico alemán K. Daniel, quien no sólo desarrolló ensayos biológicos en animales, sino que también describió con muchos detalles su experiencia en el tratamiento de alrededor de 20 pacientes deprimidos con extractos del *H. perforatum*. Infortunadamente su publicación, que se editó antes de la segunda guerra mundial, no recibió mucha atención en los años siguientes (MÜLLER, 2005).

La historia moderna del *H. perforatum* probablemente comienza en 1984, cuando la Comisión E de la antigua Agencia Federal de Salud alemana publicó una monografía en sentido positivo acerca del *H. perforatum*, recomendando su uso en alteraciones psicoautonómicas, conducta depresiva, nerviosismo y ansiedad. Ésta recomendación estaba basada principalmente en el uso y en la experiencia tradicional más que en datos científicos (MÜLLER, 2005).

## 2.2 ESTADO DE LA INVESTIGACIÓN

Al realizar la revisión bibliográfica, se observó la ausencia de estudios referentes a la actividad antidepresiva del *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium* e *H. silenoides*. Sin embargo se encontraron numerosos estudios de otras especies del género *Hypericum* con actividad de tipo antidepresivo, destacando el *H. perforatum*, *H. caprifoliatum* e *H. polyanthemum* por lo que se mencionan como antecedentes del presente estudio, los cuales brindaron alcances para empezar con la presente investigación.

## 2.3 ANTECEDENTES

### 2.3.1 ANTECEDENTES BOTÁNICOS

#### 2.3.1A LA SUBFAMILIA *Hypericoideae*.

AVATO (2005), del Departamento Fármaco-químico, Universidad de Bari, Italia, en su artículo "**A survey on the *Hypericum* genus: Secondary metabolites and bioactivity**" (Un estudio del género *Hypericum*: metabolitos secundarios y bioactividad) señala:

*Hypericoideae* es una subfamilia de la familia botánica *Clusiaceae* Lindley. La familia fue conocida anteriormente como *Guttiferae* (que contiene goma) de Jussieu, debido a la presencia de canales secretores o cavidades que contienen exudados claros o coloreados típicos de este grupo de plantas. Se reconocen tres subfamilias dentro de *Clusiaceae*: la *Kielmeyeroideae*, la *Clusioideae* y la *Hypericoideae*. Esta última incluye a los géneros *Cratoxylum*, *Harungana*, *Psorospermum*, *Vismia* e *Hypericum*, siendo esta última frecuentemente clasificada como una familia separada por el elevado número de especies que comprende.

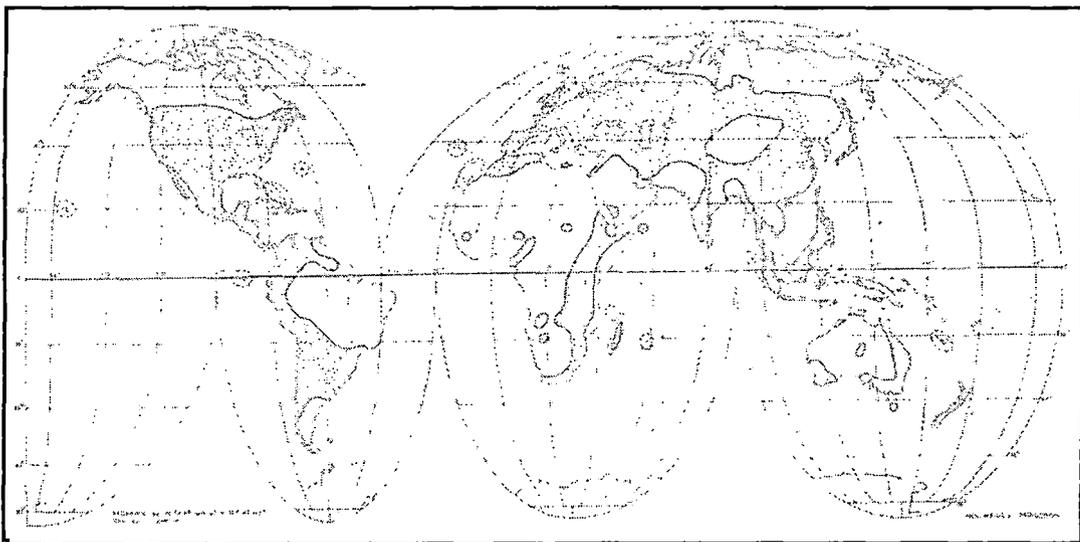
#### 2.3.1B EL GÉNERO *Hypericum*.

ROBSON (1977) del departamento de Botánica del Museo de Historia Natural, Londres, Inglaterra, en sus monografías "**Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 1. Infrageneric classification**" y "**Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 2. Characters of the genus**" (Estudios en el género *Hypericum* L.

(Guttiferae) 1. Clasificación infragenerica y Estudios en género *Hypericum* L. (Guttiferae) 2. Características del género) señala:

El género *Hypericum* (tribu *Hypericeae*, subfamilia *Hypericoideae*) incluye más de 400 especies, divididas en más de 36 secciones taxonómicas en base a su morfología. Las especies pueden variar desde plantas herbáceas anuales o perennes, de 5-10 cm de altura, a arbustos y árboles de unos 12 m de altura. Este género presenta una distribución mundial y habita regiones templadas y trópicos montañosos. Las especies del género *Hypericum* que pueblan todo el territorio Peruano, pertenecen a las secciones *Brathys* y *Trigynobrathys*.

**FIGURA N°1.** Distribución mundial del género *Hypericum* (zonas sombreadas).



FUENTE: ROBSON, 1977.

### 2.3.1C LAS SECCIONES *Brathys* y *Trygynobrathys*.

ROBSON (1987 y 1990) del departamento de Botánica del Museo de Historia Natural, Londres, Inglaterra, en sus monografías "**Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 7. Section 29. *Brathys* (part 1)**" y "**Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 8. Sections 29. *Brathys* (part 2) and 30. *Trigynobrathys***" (Estudios en el género *Hypericum* L. (Guttiferae) 7. Sección 29. *Brathys* (Parte 1) y Estudios en el género *Hypericum* L. (Guttiferae) 8. Sección 29. *Brathys* (Parte 2) y 30 *Trigynobrathys*) señala:

La sección ***Brathys*** comprende 88 especies de arbustos (raramente arboles pequeños), subarbustos e hierbas pequeñas anuales (raramente

perennes) distribuidas principalmente en dos centros: Belice y Cuba, y la frontera de Venezuela con Colombia. Desde esta última área, se han irradiado especies, principalmente arbustivas, hacia el este de Roraima (Brasil), hacia el oeste a Rosta Rica, y hacia el sudoeste a lo largo de los Andes y Bolivia.

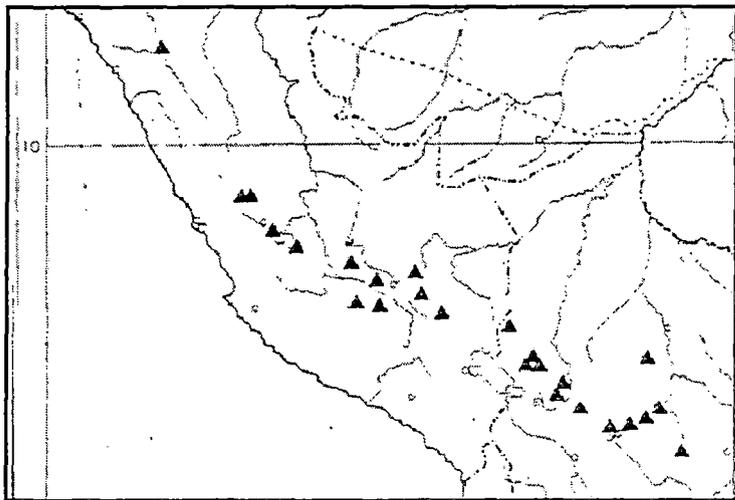
La sección *Trigynobrathys* comprende 52 especies de arbustos, subarbustos, como también hierbas anuales y perennes. La principal área de especiación ha sido el sudeste de Brasil, con una radiación primaria hacia el norte y este de Brasil, sudoeste de los E.E.U.U., hacia el sur de Uruguay y hacia el norte de Argentina, hacia el oeste de Bolivia y Perú, y norte de Chile y desde allí hacia el norte a lo largo de los Andes, al sur de Colombia y las Islas Galápagos, y hacia Nueva Zelanda, Australia, Nueva Caledonia y Nueva Guinea y ocurrencia dispersa en el sudoeste de Asia.

El *H. andinum* e *H. laricifolium* pertenecen a las secciones *Brathys*, mientras que el *H. brevistylum* e *H. silenoides* pertenecen a la sección *Trigynobrathys*. La descripción, distribución, nombres comunes y usos reportados se describen a continuación basados en las monografías anteriormente descritas:

### 2.3.1D *Hypericum andinum* GLEASON (SECCIÓN BRATHYS).

**Distribución:** Las áreas de distribución que inicialmente se describieron para esta especie comprenden distintas localidades de Perú y Bolivia.

**FIGURA N°2.** Distribución del *Hypericum andinum* ( $\Delta$ ): Perú (La Libertad, Junín, Huancavelica, Cusco, Puno), Bolivia (La Paz, Cochabamba, Santa Cruz).



FUENTE: ROBSON 1977.

**Descripción:** *Arbusto* de 0.1 a 0.5 m de alto, erecto o decumbente. *Tallos* rojizos a amarillo-marrón. *Hojas* sésiles, erectas a curvadas, lámina de 3.5-10 x 0.8-1.5 mm, densas glándulas laminares, observables por debajo. *Inflorescencias* cimosas. *Pedículo* de 3-6 mm. *Flores* de 10-18 mm en diámetro, en forma de estrella. *Sépalos* de 3.5-7 x 0.8-2 mm, lanceolados y acuminados. *Pétalos* oblongo-obovados de color amarillo de 6-10 x 3-5 mm con glándulas. *Estambres* 20-50, el más largo de 3-6 mm. *Ovario* 1,8-2,3 x 1-1,2 mm, estrechamente ovoide, 3 estilos, de 1.5 -2.5 mm de largo. *Cápsula* de 4-6 x 1.2-3 mm, ovoide, más corta que los sépalos. *Semillas* no examinadas.

**Nombres comunes y usos:** En la localidad de Calca, en el valle de Lares y el valle de Amparaes se le conoce como “Chinchamali” (comunicación personal con pobladores locales). No se han reportado sus usos.

### **2.3.1E *Hypericum laricifolium* JUSS (SECCIÓN BRATHYS).**

**Distribución:** Esta especie presenta una distribución que abarca territorios desde el oeste de Venezuela y continúa a través de la cordillera central y oriental de Colombia y Ecuador hasta el Perú.

**Descripción:** *Arbusto o árbol* pequeño de 0.3 a 3 m de alto, espeso o estricto y extendido, con ramas erectas a extendidas. *Tallos*, de 4 líneas en plantas jóvenes, eventualmente circulares, de color marrón-oscuro, cortex con escamas exfoliadas en franjas o irregularmente. *Hojas* sésiles, extendidas o erectas, a veces imbricadas; lámina 3-6 x 0.3-2.2 mm con glándulas laminares densas, usualmente visibles solo por encima. *Inflorescencias* cimosas. *Pedículo* de 1.5-5 mm de longitud. *Flores* de 15-25 mm en diámetro, en forma de estrella. *Sépalos* 3-7 x 0.7-2.2 mm, oblongos o elípticos a ovado o lanceolado; glándulas lineares. *Pétalos* de color amarillo brillante a amarillo-naranja, 7-14 x 4-10 mm, oblicuamente ovados; presencia de glándulas. *Estambres* 70-110, más largo de 4-7 mm de largo. *Ovario* 2-3.5 x 10.8-1.5 mm, elipsoide, 3 estilos, 4-9 mm de largo. *Cápsula* 4-5 x 2-2.5 mm, elipsoide, más pequeños que los sépalos. *Semillas* de 0.8-1 mm de largo.

**Nombres Comunes usos:** En el norte del País esta especie es conocida como “Chinchahual” y “Chinchanga o Chinchango”. Las decocciones de tallos y hojas son utilizadas para teñir del amarillo el algodón y la lana; también es utilizada para el tratamiento de las verrugas.

**FIGURA N°3.** (Izquierda) Distribución del *Hypericum laricifolium* (O): Desde el oeste de Venezuela (Lara, Trujillo, Mérida, Zulia) a través de la cordillera central y oriental de Colombia y Ecuador hasta el Perú (Huánuco, Ancash). **FIGURA N°4.** (Derecha) Representación del *Hypericum laricifolium*.



FUENTE: ROBSON 1977.

### 2.3.1F *Hypericum brevistylum* CHOISY (SECCIÓN TRIGYNOBRATHYS).

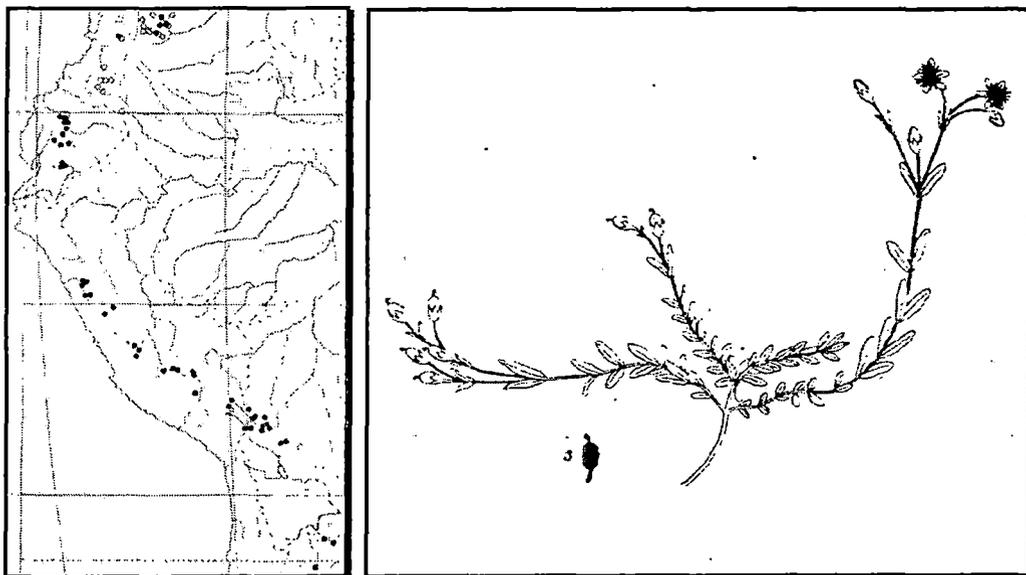
**Distribución:** Presenta una amplia área de distribución, desde los andes de Colombia y Ecuador, hasta Perú, Bolivia y Argentina.

**Descripción:** Hierba anual o perene, de 0.05 a 0.18 m de largo con ramas ascendentes a postradas. Tallos de color naranja-marrón a verde. Hojas sésiles; lámina 5-10 x 1-4 mm, elípticas o elíptico-oblongas a oblanceoladas con glándulas laminares muy densas. Inflorescencias cimosas. Pedículo de 1.5-3.5 mm. Flores de 6-8 mm en diámetro, en forma de estrella. Sépalos 2.5-6 x 0.6-0.2 mm, desiguales, imbricados, estrechamente oblongas, presencia de

glándulas lineal. *Pétalos* de color amarillo brillante, 2.5-7 x 1-2 mm, a veces teñido de rojo, oblanceoladas; ausencia de glándulas. *Estambres* 10-13, el más largo de 1.8-3.5 mm de largo. *Ovario* 1.3-2 x 0.8-1 mm, elipsoide o ovoide, 3 estilos, 0.4-0.6 mm de largo. *Cápsula* 5-8 x 1.7-3.5 mm, estrechamente elipsoide a estrechamente cilíndrica. *Semillas* de 0.5-0.7 mm de largo.

**Nombres comunes y usos:** No reportados.

**FIGURA N°5.** (Izquierda) Distribución del *Hypericum brevistylum* (O): Colombia (Cundinamarca, Valle de Cauca), Ecuador, Perú (Huánuco y Ancash hasta Puno), Bolivia (La Paz, Cochabamba, Tarija), Argentina (Jujuy, Salta). **FIGURA N°6.** (Derecha) Representación del *Hypericum brevistylum*.



FUENTE: ROBSON 1990; CHOISY 1821.

### **2.3.1G *Hypericum silenoides* JUSS (SECCIÓN TRIGYNOBRATHYS).**

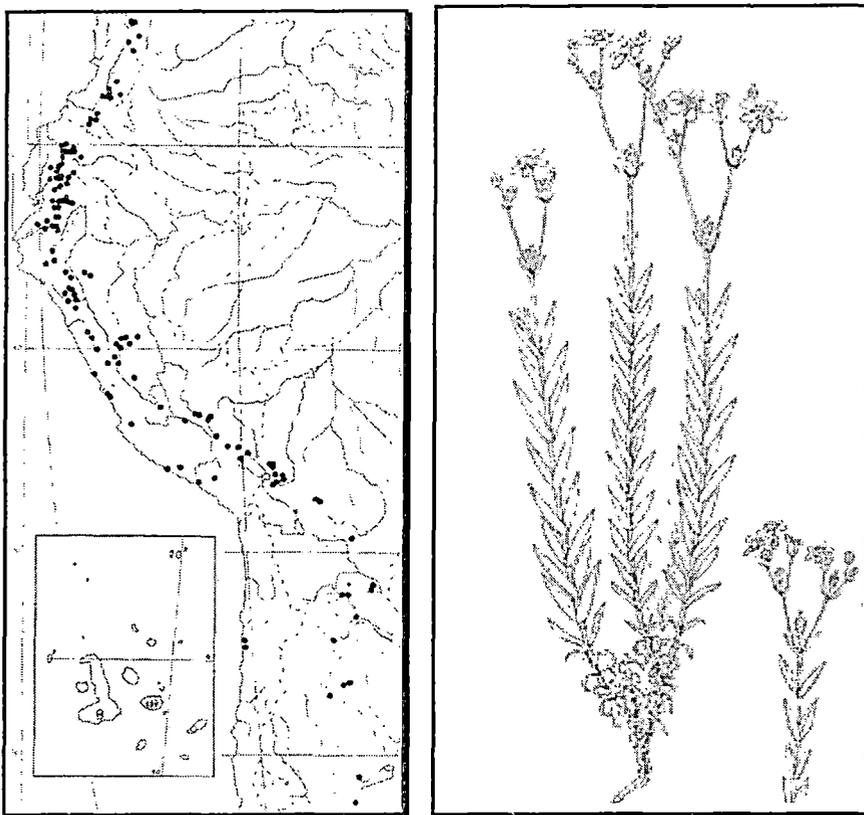
**Distribución:** Esta especie está distribuida en zonas abiertas, arenosas o rocosas, secas o húmedas, pero bien drenadas; 0-850 m.s.n.m (desde Chile a la costa del Perú), 900-3900 m.s.n.m. (Ecuador, Colombia, tierras altas del Perú, Bolivia, Argentina), 600-945 m.s.n.m (Islas Galápagos).

**Descripción:** *Hierba* anual o perene, de 0.1 a 0.5 m de alto, erguido a veces decumbente. *Tallos* de color verde o rojo intenso. *Hojas* sésiles; lámina 6-26 x 1-6 mm, lanceoladas a elípticas o estrechamente oblongas con glándulas

laminares muy densas, pero pequeñas y oscuras. *Inflorescencias* cimosas. *Pedículo* de 2-17 mm. *Flores* de 9-14 mm en diámetro, en forma de estrella. *Sépalos* 2-6 x 0.7-1.5 mm, desiguales, imbricados, estrechamente oblongas, glándulas lineal. *Pétalos* de color amarillo-naranja, 4-8 x 1-2 mm, con manchas rojas, oblanceoladas a oblongas; presencia de glándulas. *Estambres* 14-32, el más largo de 2-5 mm de largo. *Ovario* 0.8-2 x 0.5-0.7 mm, estrechamente ovoide-elipsoide, 3 estilos, 0.7-2 mm de largo. *Cápsula* 4.5-8 x 2-3.5 mm, estrechamente ovoide-cilíndrico. *Semillas* de 0.5 mm de largo.

**Nombres comunes y usos:** En la cuenca Gallega, distrito de Morropón - Piura, se le conoce como "corazoncillo" e "hierva de la rabia". En la cuenca del río Ocoña, Parinacochas - Ayacucho, se le conoce como "sunchito". Sus usos no han sido reportados.

**FIGURA N°7.** (Izquierda) Distribución del *Hypericum silenoides* (O): Chile (Antofagasta), Perú (Arequipa hasta Lima, Cajamarca y Piura hasta Cuzco), Ecuador, Colombia (Nariño, Cauca, Antioquia), Bolivia (sureste), Argentina (Jujuy hasta Córdoba). **FIGURA N°8.** (Derecha) Representación del *Hypericum silenoides*.



FUENTE: ROBSON 1990.

## 2.3.2 ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS

Las especies del género *Hypericum* se han utilizado como remedios tradicionales en varias partes del mundo. Entre las diferentes especies, a lo largo de la historia, en particular, el *H. perforatum* (hierba de San Juan) ha ganado gran reputación como antiinflamatorio y cicatrizante. Sin embargo, el uso actual de esta planta es sobre todo como antidepresivo. El alto valor biológico de esta especie en todo el mundo ha incrementado el interés por el estudio de la composición química y propiedades farmacológicas de especies afines. Este género ha resultado ser una fuente fecunda de varias moléculas con estructuras químicas únicas.

### 2.3.2A NAFTODIANTRONAS EN EL GÉNERO *Hypericum*.

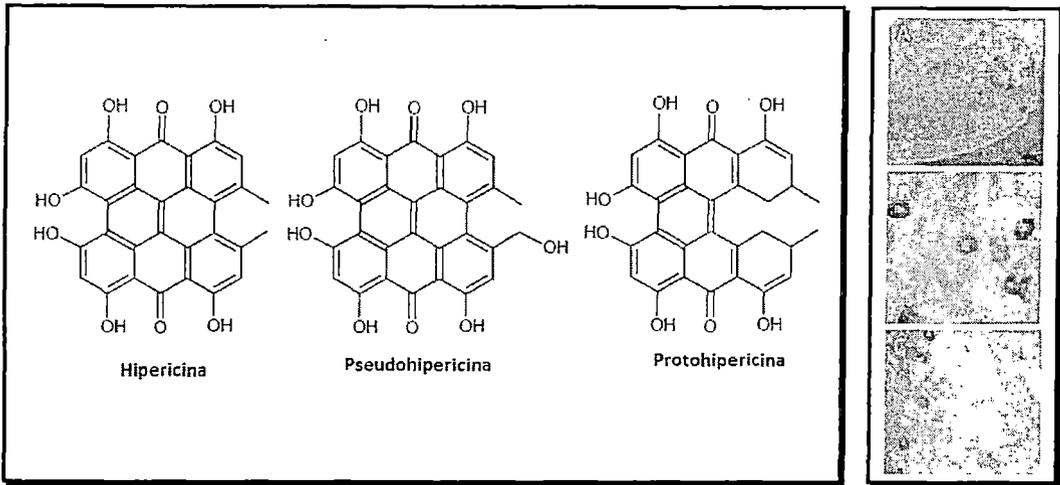
HOSTETTMANN y WOLFENDER (2005) del Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica, Sección de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Génova, Suiza, en el capítulo "Phytochemistry" del libro "**St. John's Wort and its Active Principles in Depression and Anxiety**" (Capítulo de "Fitoquímica" del libro "Hierba de San Juan y sus principios activos en la depresión y ansiedad") describen lo siguiente:

Las naftodiantronas aisladas del género *Hypericum* incluyen a la hipericina y pseudohipericina que son potentes fotosensibilizantes, responsables del síndrome denominado como hipericinismo, una fotodermatitis que afecta al ganado que consume plantas de *Hypericum*.

Los llamados protoderivados, protohipericina y protopseudohipericina, a falta del enlace 4,4', han sido aislados de material vegetal fresco y representan los precursores de la biosíntesis de compuestos más estables, hipericina y pseudohipericina, respectivamente.

Las hipericinas son responsables del color rojo/negro de las glándulas que se encuentran en las hojas y pétalos de las especies de *Hypericum*. Este pigmento no es un componente natural común, hasta ahora ha sido aislado exclusivamente de las plantas del género *Hypericum* y de algunas especies de insectos donde actúa como un fotorreceptor, por lo que se ha propuesto como posible marcador quimiotaxonómico de las especies que pertenecen a este género.

**FIGURA N°9.** (Izquierda) Naftodiantronas del género *Hypericum*. **FIGURA N°10.** (Derecha) Glándulas negras en: hojas (A), estambres (B) y pétalos (C) del *Hypericum perforatum*.



FUENTE: HOSTETTMANN y WOLFENDER, 2005; ZOBAYED *et al.*, 2006.

MATHIS y OURISSON (1976) de la Facultad de Farmacia y el Instituto de Química de la Universidad de Estrasburgo, Francia, en su publicación “Étude chimio-taxonomique du genre *Hypericum* I. Répartition de l'hypericine” (Estudio quimiotaixonómico del género *Hypericum* I. distribución de hipericina) y FERRAZ *et al.*, (2002a) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Federal de Rio Grande del Sur, Porto Alegre, Brasil, en su artículo “Screening for the presence of hypericins in southern brazilian species of *Hypericum*” (cribado de presencia de hipericinas en especies de *Hypericum* del sur del Brasil) determinan:

Existe una buena correlación entre la presencia de glándulas negras e hipericinas. Sin embargo, a pesar de que estos pigmentos, hipericina y pseudohipericina, y las glándulas negras son característicos de la subfamilia *Hypericoideae*, estos no están presentes en todas las especies del género *Hypericum*. Las especies de las secciones *Brathys* y *Trigynobrathys* del género *Hypericum* carecen de glándulas negras, así, hasta la fecha no se ha detectado hipericinas dentro de los miembros de estas secciones.

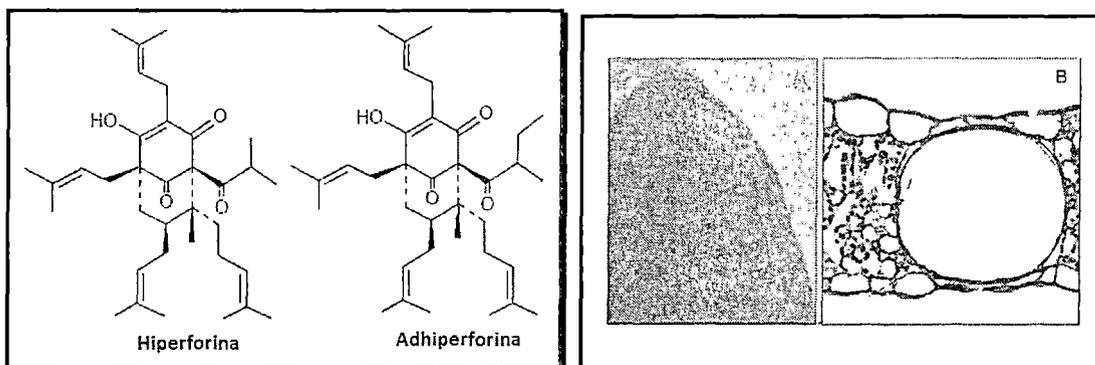
### 2.3.2B FLOROGLUCINOLES EN EL GÉNERO *Hypericum*.

SOELBERG *et al.*, (2007) del Laboratorio de Botánica del Instituto Biológico del Departamento de Biología Evolutiva de la Universidad de Copenhague, Dinamarca, en su artículo “Hyperforin accumulates in the translucent glands of

***Hypericum perforatum***” (Hiperforina se acumula en las glándulas translúcidas del *Hypericum perforatum*) y AVATO (2005), afirman:

Los acilfloroglucinoles son otros compuestos característicos de la familia *Clusiaceae*. También están presentes en el *Cannabaceae*, en la *Euphorbiaceae*, en las *Rosaceae* y en algunos helechos. La hiperforina y adhiperforina son los principales floroglucinoles prenilados aislados del *H. perforatum*. Se ha demostrado que la hiperforina es sintetizada por la misma maquinaria biosintética que los monoterpenos en los cloroplastos de las células que delimitan las glándulas translúcidas del *H. perforatum*. En la biosíntesis de esta molécula, tres moléculas de dimetilalil difosfato y una de geranil difosfato son unidas a una molécula básica de floroglucinol por sustitución electrófila.

**FIGURA N°11.** (Izquierda) Floroglucinoles del *Hypericum perforatum*: hiperforina e adhiperforina. **FIGURA N°12.** (Derecha) Glándulas negras y translúcidas del *Hypericum perforatum*. (A) Glándulas translúcidas de la sección del extremo superior de una hoja. (B) Corte transversal de una hoja con glándula translúcida.



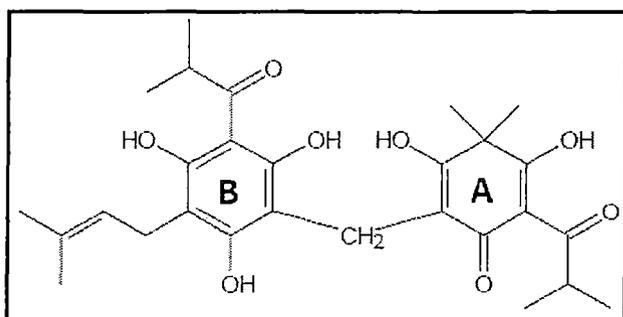
FUENTE: HOSTETTMANN y WOLFENDER, 2005; SOELBERG *et al.*, 2007.

FERRAZ *et al.*, (2002b) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Federal de Rio Grande del Sur, Porto Alegre, Brasil, en su publicación “**Uligosin B from *Hypericum myrianthum***” (Uligosina B del *Hypericum myrianthum*) y NÖR *et al.*, (2004) de la misma filiación anterior en su artículo “**Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the *Trigynobrathys* section**” (Derivados del floroglucinol de cuatro especie de *Hypericum* pertenecientes a la sección *Trigynobrathys*) señalan:

Los estudios fitoquímicos de diferentes especies de *Hypericum* han demostrado que este género es una valiosa fuente de floroglucinoles. Varios floroglucinoles prenilados, no relacionados con la hiperforina y, a veces únicos

en su estructura han sido identificados dentro de las especies pertenecientes a las secciones *Brathys* y *Trigynobrathys*. La estructura básica de estos componentes implica una fracción floriglucinol (anillo B) y otra fracción acilada de ácido filicínico (anillo A), unidos a través de un puente metileno.

**FIGURA N°13.** Estructura básica de los floriglucinoles derivados del ácido filicínico.

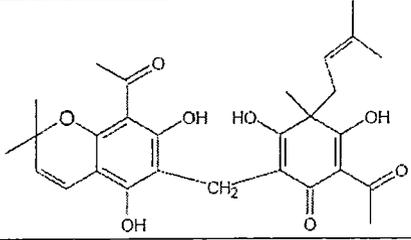
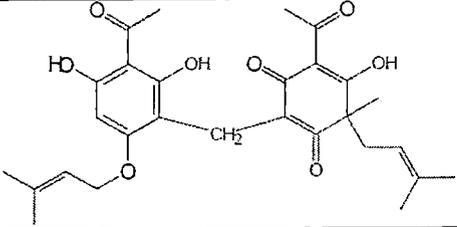
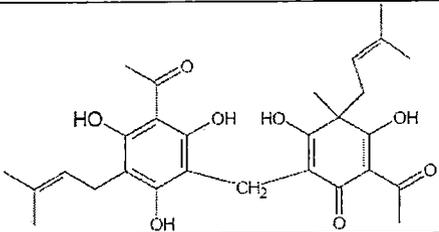
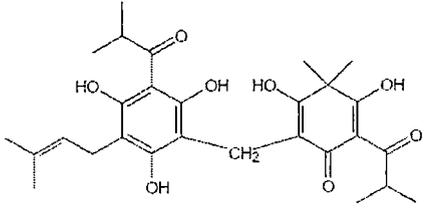
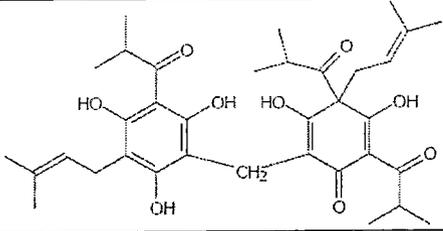
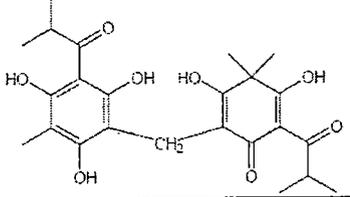
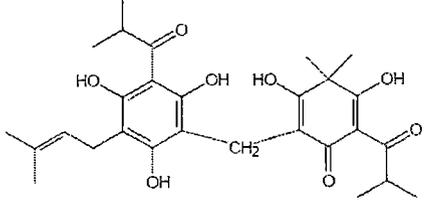
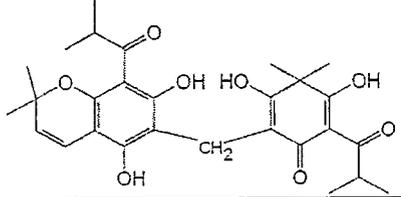


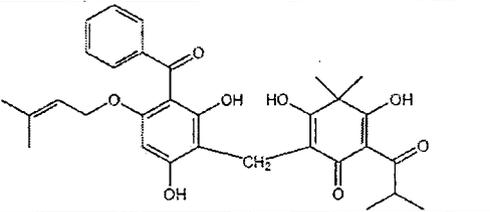
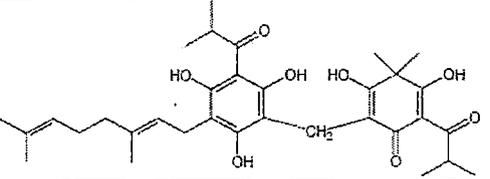
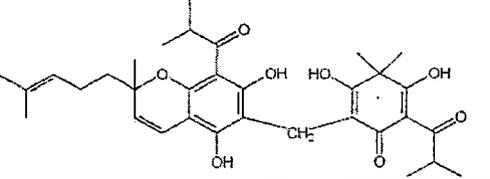
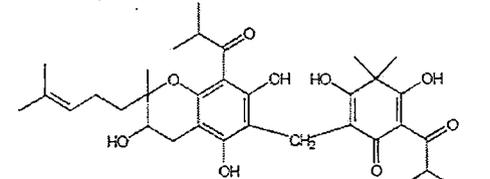
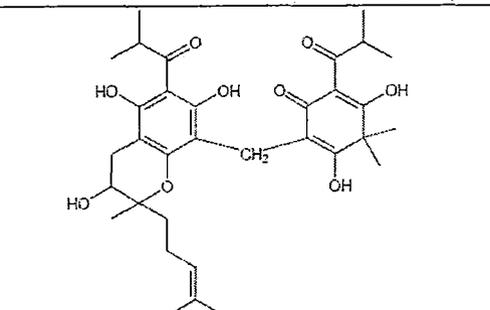
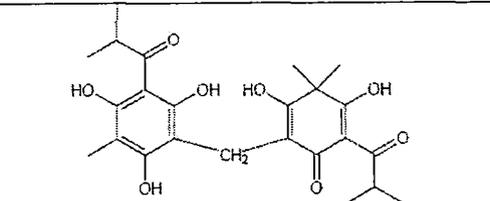
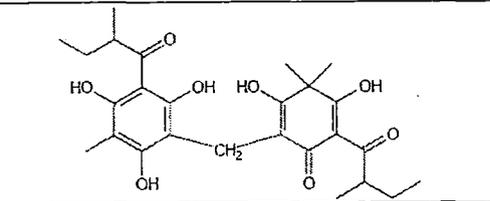
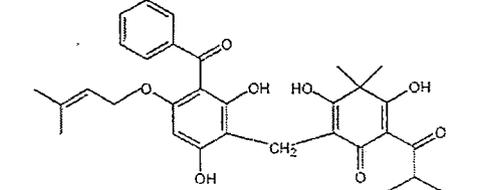
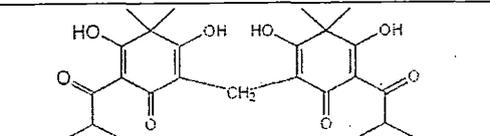
FUENTE: PAL SINGH y BHARATE, 2006.

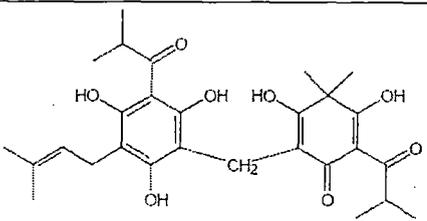
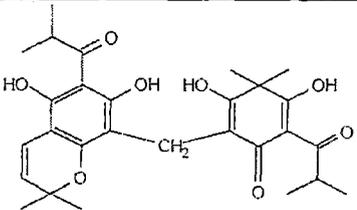
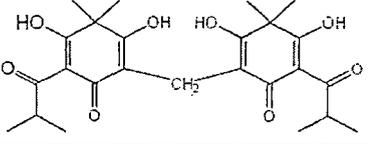
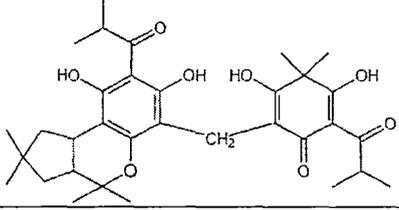
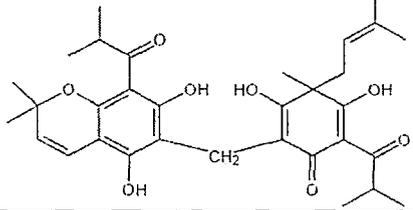
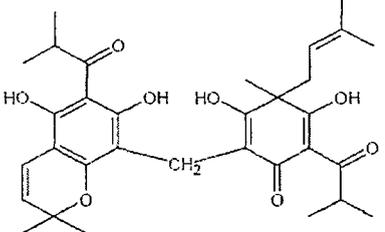
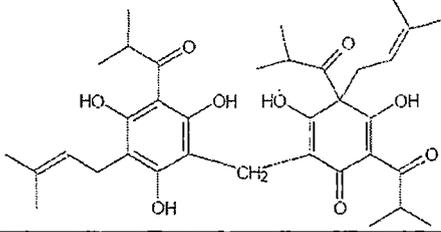
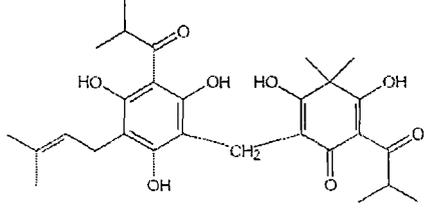
NÖR (2006) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Federal de Rio Grande del Sur, Porto Alegre, Brasil, en su trabajo "Análise química e taxonômica de espécies de *Hypericum* e avaliação da atividade antiangiogênica" (Análisis química y taxonómica de especies de *Hypericum* y evaluación de actividad antiangiogénica) presenta un resumen de los floriglucinoles aislados de las especies de *Hypericum* de las secciones *Brathys* y *Trigynobrathys*:

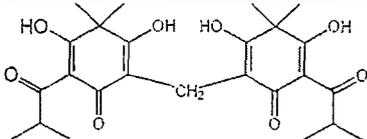
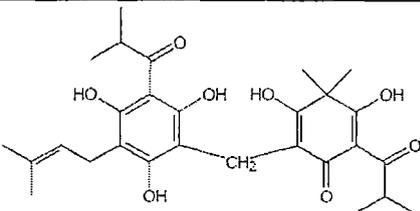
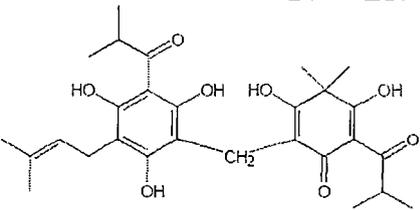
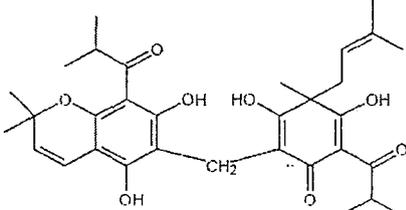
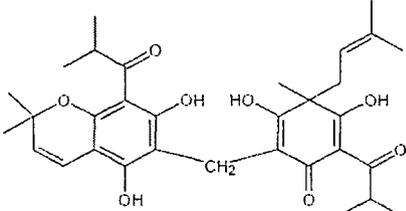
**TABLA N°1.** Floriglucinoles diméricos aislados de especies de *Hypericum* de las secciones *Brathys* y *Trigynobrathys*.

SECCIÓN	ESPECIE	FLOROGLUCINOL	ESTRUCTURA	AUTOR
<i>Brathys</i>	<i>Hypericum drummondii</i>	Drumondina A		JAYASURIY et al., 1989
		Drumondina B		JAYASURIY et al., 1989
		Drumondina C		JAYASURIY et al., 1989

		Drumondina D		JAYASURIY <i>et al.</i> , 1991
		Drumondina E		JAYASURIY <i>et al.</i> , 1991
		Drumondina F		JAYASURIY <i>et al.</i> , 1991
	<i>Hypericum gentianoides</i>	uliginosina A		BABKA <i>et al.</i> , 2010
		Hiperbrasilol C		BABKA <i>et al.</i> , 2010
		Saroaspidina A		BABKA <i>et al.</i> , 2010
<i>Trigynobrathys</i>	<i>Hypericum uliginosum</i>	Uliginosina A		TAYLOR <i>et al.</i> , 1996
		Uliginosina B		TAYLOR <i>et al.</i> , 1996

<i>Hypericum japonicum</i>	Sarotralino		ISHIGURO <i>et al.</i> , 1986
	Sarotraleno A		ISHIGURO <i>et al.</i> , 1986
	Sarotraleno B (Japonicina B)		ISHIGURO <i>et al.</i> , 1986
	Sarotraleno C		ISHIGURO <i>et al.</i> , 1994
	Sarotraleno D		ISHIGURO <i>et al.</i> , 1994
	Saroaspidin A		ISHIGURO <i>et al.</i> , 1987
	Saroaspidin B		ISHIGURO <i>et al.</i> , 1987
	Saroaspidin C		ISHIGURO <i>et al.</i> , 1987
	Japonicina A		YAMAKI <i>et al.</i> , 1994

<i>Hypericum brasiliense</i>	Uliginosina A		ROCHA et al., 1995
	Isouliginosina A		ROCHA et al., 1995
	Japonicina A		ROCHA et al., 1995
	Hiperbrasilot A		ROCHA et al., 1995
	Hiperbrasilot B		ROCHA et al., 1996
	Isohiperbrasilot B		ROCHA et al., 1996
	Hiperbrasilot C		ROCHA et al., 1996
<i>Hypericum myrianthum</i>	Uliginosina B		FERRAZ et al., 2002b

	Japonicina A		DALL' AGNOL <i>et al.</i> , 2005
<i>Hypericum polyanthemum</i>	Uliginosina B		NÖR <i>et al.</i> , 2004
<i>Hypericum carinatum</i>	Uliginosina B		NÖR <i>et al.</i> , 2004
<i>Hypericum caprifoliatum</i>	Hiperbrasilol B		NÖR <i>et al.</i> , 2004
<i>Hypericum connatum</i>	Hiperbrasilol B		NÖR <i>et al.</i> , 2004

FUENTE: Adaptado de NÖR, 2006.

### 2.3.2C FLAVONOIDES EN EL GÉNERO *Hypericum*.

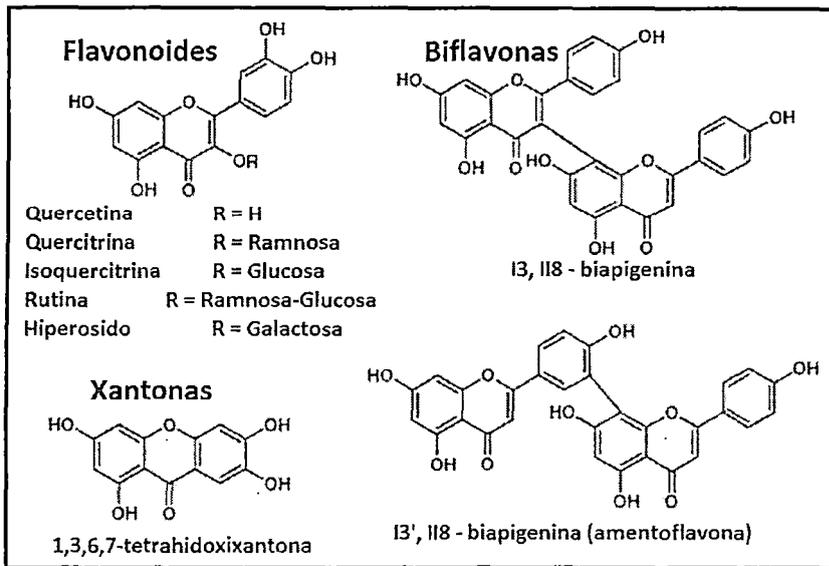
EL-SEEDI *et al.*, (2003) de la División de Farmacognosia del Departamento de Química Medica del Centro Biomédico de la Universidad de Uppsala, Suecia en su trabajo "**Constituents of *Hypericum laricifolium* and their cyclooxygenase (COX) enzyme activities**" (Constituyentes del *Hypericum laricifolium* y sus actividades sobre la enzima ciclooxygenasa (COX)),

NUNES *et al.*, (2010) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Federal de Rio Grande del Sur, Porto Alegre, Brasil, en su trabajo "**Phenolic compounds in *Hypericum* species from the *Trigynobrathys* section**" (Compuestos fenólicos en especies de *Hypericum* de la sección *Trigynobrathys*) y AVATO, 2005 afirman:

Los flavonoides presentes en los extracto alcohólicos de las partes aéreas del *H. perforatum* están constituidos por el flavonol quercetina y sus glucósidos, rutina, hiperósido, isoquercitrina, quercitrina, y las biflavonas I3, I18 -

biapigenina y 13', 118 -biapigenina (amentoflavona). El contenido de estos metabolitos en las flores es elevado durante la etapa inicial de florecimiento, hasta 12% en peso seco. Sin embargo la presencia del flavonoide rutina no ha podido ser confirmada en las especies de la sección *Trigynobrathys*.

**FIGURA N°14.** Flavonoides y xantonas del *Hypericum perforatum*.



FUENTE: HOSTETTMANN y WOLFENDER, 2005.

**TABLA N°2.** Compuestos fenólicos presentes en especies del género *Hypericum* de las secciones *Brathys* y *Trigynobrathys*. (+): Presencia. (-): Ausencia.

ESPECIE	ACIDO CLOROGÉNICO	RUTINA	HIPERÓSIDO	QUERCITRINA	ISOQUERCITRINA
<i>H. campestre</i>	+	-	+	+	+
<i>H. caprifoliatum</i>	+	-	+	+	+
<i>H. carinatum</i>	+	-	+	+	+
<i>H. connatum</i>	+	-	+	+	+
<i>H. cordatum</i>	+	-	+	+	+
<i>H. linoides</i>	+	-	+	+	+
<i>H. laricifolium</i>	+	+	+	+	+
<i>H. lorentzianum</i>	+	-	+	+	+
<i>H. megapotamicum</i>	+	-	+	+	+
<i>H. myrianthum</i>	+	-	+	+	+
<i>H. polyanthemum</i>	+	-	+	+	+
<i>H. rigidum</i>	+	-	+	+	+
<i>H. salvadorensense</i>	+	-	+	+	+
<i>H. ternum</i>	+	-	+	+	+

FUENTE: EL-SEEDI 2003 y NUNES *et al.*, 2010

### 2.3.2D XANTONAS EN EL GÉNERO *Hypericum*.

ROCHA *et al.*, (1994) del Instituto de Farmacognosia y Fitoquímica de la Escuela de Farmacia de la Universidad de Lausana, Suiza, en su artículo “**An antifungal  $\gamma$ -pyrone and xanthones with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense***” (Una  $\gamma$ -pirona antifúngica y xantonas con actividad inhibitoria monoamino oxidasa del *Hypericum brasiliense*),

RAMÍREZ *et al.*, (2004) en su trabajo “**Aislamiento e identificación de xantonas de las hojas del *Hypericum laricifolium* Juss. (Guttiferae)**”, con filiación al Laboratorios de Productos Naturales y al Laboratorio de RMN de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela,

DEMIRKIRAN (2007) del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias y Artes de la Universidad de Trakya, Turquía, en su artículo “**Xanthones in *Hypericum*: synthesis and biological Activities**” (Xantonas en *Hypericum*: síntesis y actividades biológicas) y

CROCKETT *et al.*, (2010) del Departamento de Farmacognosia del Instituto de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Karl-Franzens Graz, Austria en su trabajo “***Hypericum* species in the Páramos of Central and South America: a special focus upon *H. irazuense* Kuntze ex N. Robson**” (Especies de *Hypericum* en los Páramos de Sud y Centro América: atención especial en *H. irazuense* Kuntze ex N. Robson) afirman:

Las xantonas están ampliamente distribuidas en la familia *Clusiaceae* y varios tipos han sido aislados en el género *Hypericum*. Se ha descrito la co-ocurrencia de xantonas oxigenada simples y estructuras preniladas más complejas siendo el patrón de oxigenación 1,3,5,6, el más común para las xantonas alquiladas. Las xantonas han sido identificadas principalmente en los órganos subterráneos. Dentro de las secciones *Brathys* y *Trigynobrathys* se ha descrito la presencia de la 1,5-dihidroxixantona, 5-hidroxi-1-metoxixantona y 6-deoxyjacareubina en las raíces y tallos del *H. brasiliense*. La bijaponicaxantona, bijaponicaxantona C, jacarelhiferol A y jacarelhiferol B son algunas de las muchas xantonas aisladas del *H. japonicum*. La 6-deoxyisojacareubina y la 1,7-dihidroxi-xantona han sido aislados de las partes aéreas del *H. laricifolium*. Recientemente se ha aislado la 1,5-dihidroxixantona y cuatro xantonas preniladas de las partes aéreas del *H. irazuense*.

### 2.3.2E ÁCIDOS FENÓLICOS EN EL EN EL GÉNERO *Hypericum*.

AVATO (2005) y NUNES *et al.*, (2010) reportan:

Varios fenoles ampliamente distribuidos, como el ácido p-cumárico, ferúlico, isoferúlico, cafeico y el clorogénico, se han descrito en varias ocasiones en el *H. perforatum*. El ácido clorogénico ha sido descrito como un metabolito común en varias especies del género *Hypericum* de la sección *Trigynobrathys*.

### 2.3.2F ACEITES ESENCIALES EN EL GÉNERO *Hypericum*.

ABREU *et al.*, (2004) del Departamento de Fisiología Vegetal del Instituto de Biología de la Universidad Estatal de Campinas, Brasil en su artículo "**Essential oil composition of *Hypericum brasiliense* Choise**" (Composición del aceite esencial del *Hypericum brasiliense* Choise) y

FERRAZ *et al.*, (2005) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Federal de Rio Grande del Sur, Porto Alegre, Brasil, en su artículo "**Essential oil composition of six *Hypericum* species from southern Brazil**" (Composición de los aceites esenciales de seis especies de *Hypericum* del Sur del Brasil) afirman:

Las especies del género *Hypericum* acumulan aceites esenciales en las glándulas translúcidas. El contenido de aceite esencial en el *H. perforatum* varía de un 0.1 a 0.35% dependiendo de la temporada de cosecha y la calidad de la parte aérea. El mayor contenido esta reportado para plantas recolectadas antes de la floración. Las flores frescas también acumulan grandes cantidades (0,25%) de aceites esenciales. Dentro de las especies de las secciones *Brathys* y *Trigynobrathys*, se ha reportado un rendimiento de 0.1% de aceite esencial obtenido a partir de las partes aéreas del *H. brasiliense* dentro del que se identificó 20 sustancias de las cuales los sesquiterpenos constituyeron el 93.14%, siendo el  $\beta$ -cariofileno el principal componente constituyendo el 29.53% de la composición oleosa total. También se han estudiado los aceites esenciales de 6 especies del sur del Brasil, los cuales fueron obtenidos por hidrodestilación. El *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum*, e *H. ternum*, presentaron rendimientos del 0.2, 0.2, 0.1, 0.5, 0.2 y 0.1% respectivamente. Se caracterizaron alrededor de 84 compuestos.

Los principales compuestos determinados fueron el nonano, undecano,  $\beta$ -cariofileno, y benzopiranos.

### 2.3.3 ANTECEDENTES FARMACOLÓGICOS Y TOXICOLÓGICOS.

Los extractos hidroalcohólicos del *H. perforatum* L. son antidepresivos eficaces en pacientes, y también muestran acción antidepresiva similar en animales de laboratorio. Intensivas investigaciones fitoquímicas y farmacológicas han permitido la identificación de una serie de compuestos bioactivos dentro del extracto crudo del *H. perforatum*. La presente sección muestra las investigaciones clínica y fundamentalmente preclínicas llevadas a cabo con extractos crudos, fracciones y compuestos aislados del *H. perforatum*, *H. caprifoliatum* e *H. polyanthemum*.

#### 2.3.3A INVESTIGACIONES PRECLÍNICAS “IN VITRO” DEL *Hypericum perforatum*.

BUTTERWECK *et al.*, (2002) del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Westphalian-Wilhelms, Alemania en su trabajo “**In vitro receptor screening of pure constituents of St. John’s wort reveals novel interactions with a number of GPCRs**” (Cribado de receptores in vitro de los constituyentes puros de la hierba de San Juan releva nuevas interacciones con un numero de GPCRs) y

BUTTERWECK (2003) del Instituto de Farmacología y Toxicología del Hospital Universitario de Münster, Alemania, en su revisión “**Mechanism of action of St. John’s wort in depression**” (Mecanismo de acción de la hierba de San Juan en la depresión) señalan:

Investigaciones iniciales “*in vitro*” sobre los componentes responsable de la actividad antidepresiva de *H. perforatum* han mostrado a la hipericina como un inhibidor de las MAOs. Sin embargo, más tarde, se demostró que la muestra de hipericina utilizada estaba impura con al menos 20% de otros constituyentes, principalmente flavonoides. Así, la propiedad inhibitoria de la hipericina sobre la MAO no pudo ser confirmada en estudios posteriores. No obstante, la 1,3,6,7-tetrahidroxixantona y algunos flavonoides fueron detectados como inhibidores de la MAO-A y MAO-B, sin embargo, ninguno de

ellos mostró actividad inhibitoria de la MAO "in vivo" . Por lo tanto, se niega la posibilidad de explicar el mecanismo de acción de *H. perforatum* en función de la inhibición de las MAOs. Posteriormente, se ha demostrado que la hiperforina es capaz de inhibir la recaptación de la 5-HT, NA, DP, y/o acetilcolina, por lo menos *in vitro*, con una potencia comparable o incluso superior a los inhibidores convencionales de 5-HT y NA. Dichas investigaciones llevaron a la conclusión temporal de que la hiperforina era el principal, si no el único, componente activo de los extractos *Hypericum* con capacidad inhibitoria del metabolismo de los neurotransmisores. Sin embargo, los valores de IC<sub>50</sub> presentados para la inhibición de la recaptación de los neurotransmisores por la hiperforina en comparación con el extracto global demuestran claramente que la hiperforina por sí sola no puede ser el único responsable de la actividad total.

### **2.3.3B INVESTIGACIONES PRECLÍNICAS "IN VIVO" DEL *Hypericum perforatum*: FRACCIONES Y METABOLITOS ACTIVOS.**

BUTTERWECK *et al.*, (1997) del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Westphalian-Wilhelms, Alemania, en su trabajo "**Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity**" (Efectos del extracto total y fracciones del *Hypericum perforatum* en ensayos animales de actividad antidepresiva) y

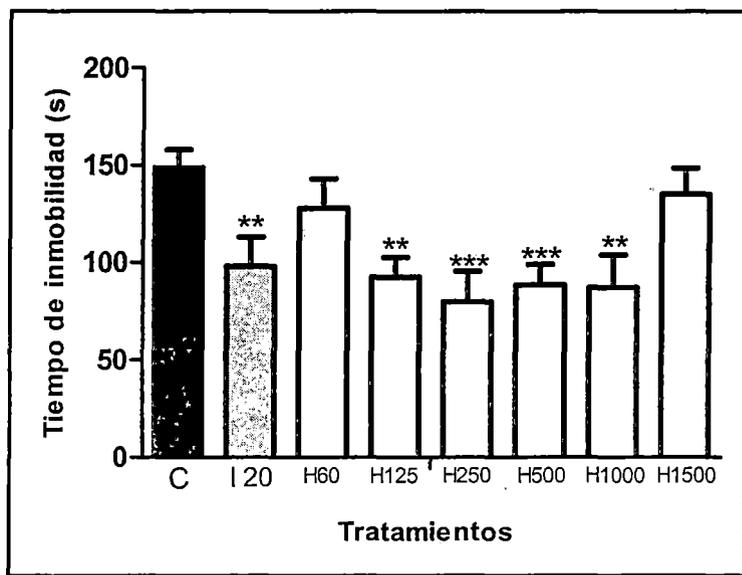
NAHRSTEDT y BUTTERWECK (2010) del Instituto de Biología Farmacéutica y Fitoquímica de la Universidad de Westphalian-Wilhelms, Alemania en su trabajo "**Lessons learned from herbal medicinal products: the example of St. John's wort**" (Lecciones aprendidas de los productos medicinales herbarios: el ejemplo de la hierba de San Juan) señalan:

Los modelos "*in vitro*" sólo se refieren a un evento y un aspecto del proceso depresivo (por ejemplo, inhibición de la MAO, inhibición de la recaptación de neurotransmisores). Dado que la depresión es una enfermedad multifactorial y compleja, los modelos animales se utilizan con frecuencia para entender todos los aspectos de la patogenia depresiva. Por lo tanto, se tomó ventaja de la ya bien validada prueba de natación forzada (PNF). La ventaja clara de la PNF en comparación con otros modelos animales de depresión es

que muestra una buena correlación con la potencia clínica de los antidepresivos sintéticos.

Estudios preclínicos “*in vivo*” iniciales han demostrado que un extracto comercial de *Hypericum* (LI160) muestra actividad significativa en la PNF. Se ha rescrito una curva dosis-respuesta en forma de U (también conocida como curva campana) entre las dosis de 125 y 1000 mg/kg, por debajo y por encima de las cuales no se observa actividad biológica.

**FIGURA N°15.** Curva dosis-respuesta del extracto LI160 en la prueba de natación forzada. C: grupo control; I20: imipramina 20mg/kg; H: diferentes dosis de extracto de *Hypericum perforatum*. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



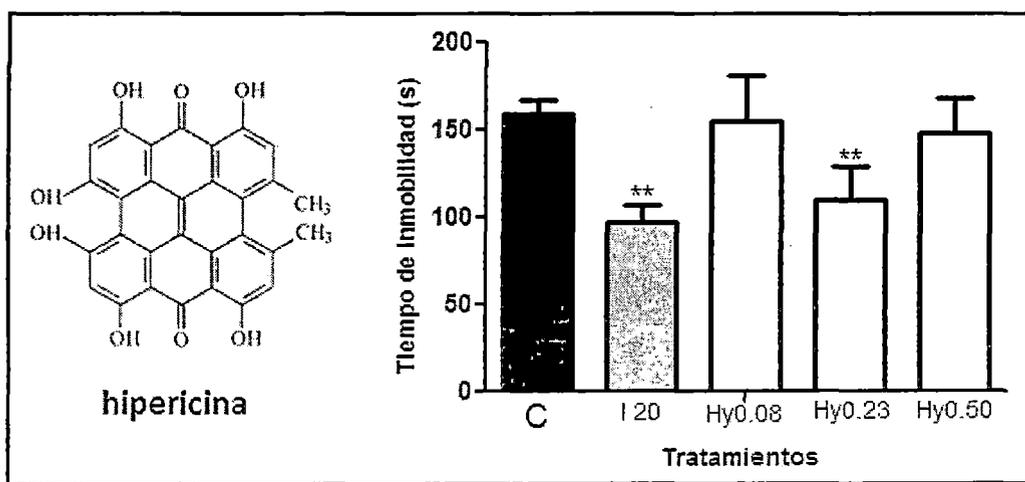
FUENTE: BUTTERWECK *et al.*, 1997.

BUTTERWECK *et al.*, (1998) del Instituto de Biología Farmacéutica y Fitoquímica de la Universidad de Westphalian-Wilhelms, Alemania en su trabajo “Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test” (Hipericina y pseudohipericina solubilizada del *Hypericum perforatum* ejercen actividad antidepresiva en la prueba de natación forzada) indica:

El fraccionamiento del extracto comercial LI160 a través de una columna cromatográfica Sephadex LH-20 rindió siete fracciones de las cuales dos fueron significativamente activas en la PNF. El análisis por TLC y HPLC de las fracciones activas mostraron que la fracción más lipofílica denominada fracción IIIc estaba constituida principalmente por hipericina y pseudohipericina. La

hipericina pura también mostró actividad en la PNF en una curva dosis-respuesta en forma de U; pero en cantidades considerablemente más altas que en la presente en el extracto crudo. Este fenómeno llevó al descubrimiento de que las proantocianidinas, presentes en la fracción IIIc mejoraban grandemente la solubilidad de la hipericina en el extracto original, mejorando así su biodisponibilidad, un claro ejemplo de sinergismo farmacocinético. Así, hoy la hipericina es ampliamente aceptada como uno de los componentes contribuyentes al efecto antidepresivo de los extractos de *Hypericum*.

**FIGURA N°16.** Curva dosis-respuesta de la hipericina en la prueba de natación forzada. C, grupo control; I20, imipramina 20mg/kg; Hy, diferentes dosis de hipericina en mg/kg. \*\* $p < 0.01$ .



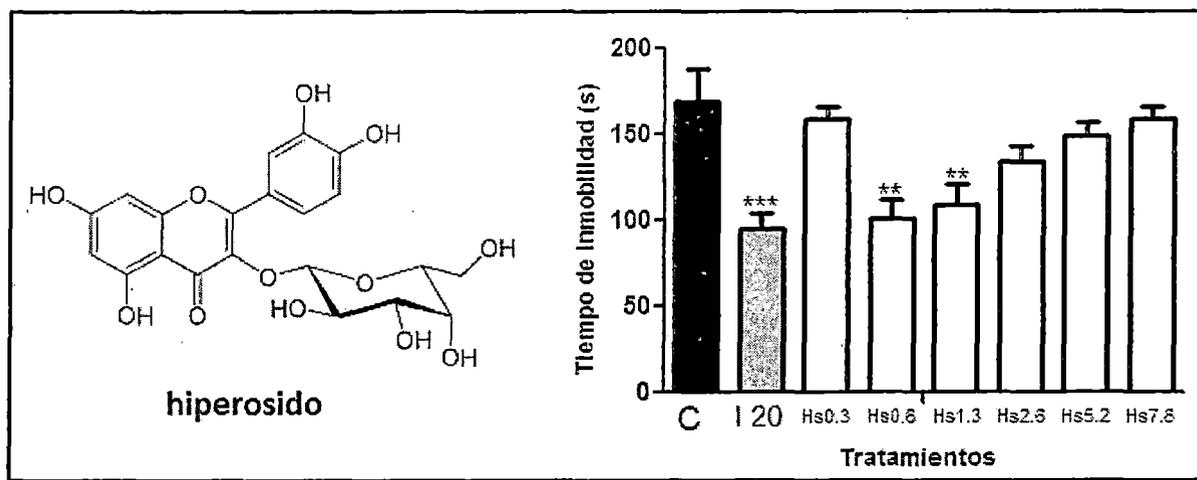
FUENTE. BUTTERWECK *et al.*, 1998

BUTTERWECK *et al.*, (2000) del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Westphalian-Wilhelms, Alemania, en su trabajo "**Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test**" (Flavonoides del *Hypericum perforatum* muestran actividad antidepresiva en la prueba de natación forzada), y NAHRSTEDT y BUTTERWECK (2010) aseveran:

La segunda fracción más activa del fraccionamiento del extracto comercial LI160 de *H. perforatum*, de carácter hidrófilo, denominada fracción II, constituida por 3-O-glucósidos de quercetina, principalmente hiperósido, quercitrina e isoquercitrina también es activa en la PNF. El hiperósido puro administrado en ratas muestra una curva dosis-respuesta en forma de U. La isoquercitrina, miquelianina, quercitrina, y astilbina a la dosis de 0,6 mg/kg (aproximadamente la cantidad de hiperósido en la dosis activa de la fracción

original II) también fueron administradas en ratas sometidas a la PNF de las que sólo la isoquercitrina y miqueliana mostraron actividad. En ese momento, hace un poco más de 10 años atrás, el hallazgo de que los glicósidos de flavonoles pudieran ejercer actividad antidepresiva se aceptó muy poco, ya que si fuese así, todas las verduras y frutas deberían ser capaces de tratar los trastornos depresivos. Sin embargo, parece ser que no todos los glicósidos de flavonoides son activos. La administración en forma de extractos enriquecidos sin haber sufrido hidrólisis por enzimas (que habitualmente están presentes en verduras y frutas), parece convertirlos en compuestos terapéuticamente beneficiosos. A la fecha, los flavonoides ya son bien aceptados como compuestos activos del SNC, que pueden alcanzar el SNC, incluso sin cambios, como se ha demostrado para la miqueliana en experimentos *in vitro*.

**FIGURA N°17.** Curva dosis-respuesta del hiperósido extraído del *Hypericum perforatum* en la prueba de natación forzada. C: grupo control; I20: imipramina 20mg/kg; Hs: diferentes dosis de hiperósido en mg/kg. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



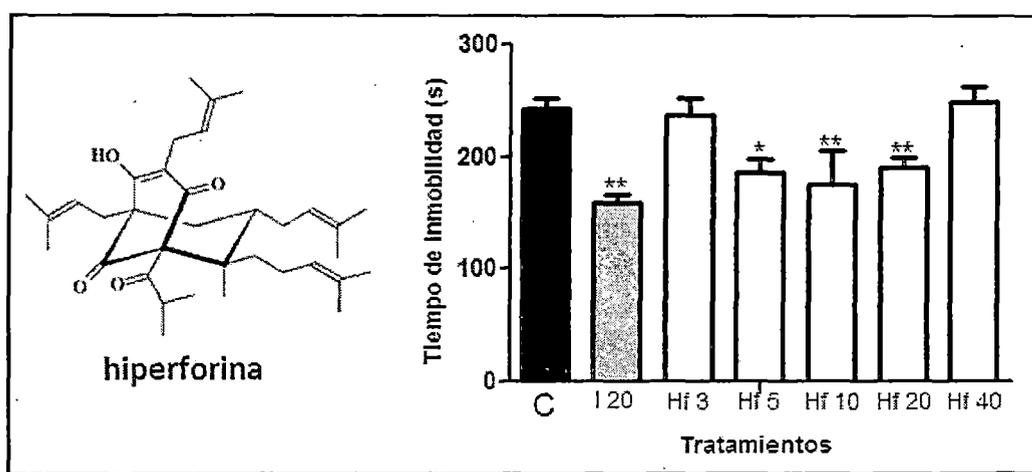
FUENTE: BUTTERWECK *et al.*, 2000.

ZANOLI *et al.*, (2002) del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Modena y Reggio Emilia, Italia, en su trabajo "**Pharmacological activity of hyperforin acetate in rats**" (Actividad farmacológica de hiperforina acetato en ratas), y NAHRSTEDT y BUTTERWECK (2010) señalan:

La hiperforina acetato, en la forma de una sal estable, también ha demostrado actividad en la PNF. Al igual que los antidepresivos clásicos, la hipericina e hiperósido, la hiperforina también muestra una curva dosis-

respuesta en forma de U. Así, la información farmacológica actual del *H. perforatum* nos muestra que un extracto vegetal terapéuticamente efectivo no sólo contiene un único componente activo o un grupo de compuestos estructuralmente relacionados, sino que puede ocurrir la presencia de varios grupos estructuralmente no relacionados pero que contribuyen a la resolución de una misma situación patológica.

**FIGURA N°18.** Curva dosis-respuesta de la hiperforina acetato en la prueba de natación forzada. C: grupo control; I20: imipramina 20mg/kg; Hf: diferentes dosis de hiperforina en mg/kg. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



FUENTE: ZANOLI *et al.*, 2002.

### 2.3.3C INVESTIGACIONES CLÍNICAS Y TOXICOLÓGICAS DEL *Hypericum perforatum*.

KASPER (2005) de la División de Psiquiatría General del Departamento de Psiquiatría de la Universidad Medica de Viena, Austria en el capítulo “**Clinical efficacy in depression**” del libro “**St. Jhon’s Wort and its Active Principles in Depression and Anxiety**” (Eficacia clínica en depresión: Hierba de San Juan y sus principios activos en depresión y ansiedad),

SCHULZ y JOHNE (2005) del Instituto de Farmacología Clínica del Hospital Universitario de Charité, Alemania en el capítulo “**Side effects and drug interactions**” del libro “**St. Jhon’s Wort and its Active Principles in Depression and Anxiety**” (Efectos secundarios e interacciones medicamentosas: Hierba de San Juan y sus principios activos en depresión y ansiedad), y

KASPER *et al.*, (2010) del Departamento de Psiquiatría de la Universidad Medica de Viena, Austria, en su trabajo “**Efficacy and tolerability of *Hypericum* extract**

**for the treatment of mild to moderate depression”** (Eficacia y tolerabilidad del extracto de *Hypericum* para el tratamiento de la depresión leve a moderada) señalan:

Existe un considerable número de ensayos clínicos llevado hasta la fecha con extractos estandarizados y no estandarizados del *H. perforatum*. Los resultados de estas investigaciones parecen indicar que la utilización de estos extractos es más efectiva que el placebo en pacientes con depresión leve a moderada. Por lo tanto su uso está justificado en el tratamiento de la depresión leve a moderada, que es ventajoso frente al tratamiento convencional con imipramina o fluoxetina, esto debido a que la utilización de estos extractos presenta un perfil favorable de reacciones adversas. No se ha podido demostrar su efectividad en paciente con depresión severa. Así, la efectividad clínica de estos extractos aun es un tema de constante discusión.

Los extractos de *H. perforatum* son en general bien tolerados y no se han reportado efectos tóxicos considerables. Sin embargo se ha notado algunos casos de fototoxicidad, lo cual ha sido correlacionado con el contenido de hipericinas de los extractos. También se ha determinado que estos extractos activan las enzimas de fase I del CYP3A4 causando disminución de la concentración plasmática de drogas importantes como la digoxina, tacrolimus, ciclosporina, etc., efecto que ha sido correlacionado con el contenido de hiperforina de dichos extractos.

### **2.3.3D INVESTIGACIONES PRECLÍNICAS DE OTRAS ESPECIES DE *Hypericum* CON ACTIVIDAD DE TIPO ANTIDEPRESIVO.**

DAUDT *et al.* (2000) del Núcleo de Farmacología del Laboratorio de Farmacognosia de la Universidad Federal de Rio Grande del Sul, Porto Alegre, Brasil, en su trabajo **“Screening for the antidepressant activity of some species of *Hypericum* from south Brazil”** (Cribado de búsqueda de actividad antidepresiva en algunas especies de *Hypericum* del sur del Brasil) Reportan:

Los extractos metanólicos de las partes aéreas de tres especies del género *Hypericum* (*H. brasiliense*, *H. caprifolatum* y *H. myrianthum*) fueron evaluados en la prueba de nado forzado utilizando ratas como animales de experimentación. Entre las especies estudiadas sólo el *H. caprifolatum* mostró

actividad. Esta planta fue fraccionada con solventes de polaridad creciente (éter de petróleo; éter de petróleo: cloroformo (1:1); cloroformo y metanol). La fracción de éter de petróleo fue la única en mostrar actividad antidepresiva a la dosis de 270 mg/Kg/día (vía intraperitoneal). El análisis químico mostró que esta fracción es rica en compuestos fenólicos, principalmente derivados del floroglucinol.

**GNERRE et al. (2001)** del Instituto de Química Terapéutica de la Sección de Farmacia de la Universidad de Lausana, Suiza, en su trabajo **“Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to south Brazil”** (Actividad inhibitoria de la monoaminoxidasa de algunas especies de *Hypericum* nativos al sur del Brasil) reportan:

Los extractos metanólicos, y las fracciones de éter de petróleo, cloroformo y metanol obtenidas de 8 especies del género *Hypericum* (*H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. cordatum*, *H. myrianthum*, *H. piriiai*, *H. polyanthemum* e *H. brasiliense*) fueron ensayados buscando actividad inhibitoria de la MAO-A y MAO-B en preparaciones mitocondriales de cerebro de rata a concentraciones de entre 1 a 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Tres benzopiranos aislados del *H. polyanthemum* (HP1, HP2, HP3) fueron también ensayados a concentraciones máximas de 150, 150 y 75  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Los extractos lipofílicos de *H. caprifoliatum*, *H. polyanthemum* e *H. piriiai*, mostraron actividad inhibitoria mayor del 50%. Entre los benzopiranos sólo el HP3 mostró actividad significativa, con un valor de  $\text{CI}_{50}$  de 22  $\mu\text{M}$ . Finalmente los extractos metanólicos de las partes aéreas del *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. cordatum*, *H. piriiai*, e *H. polyanthemum* fueron evaluados en la prueba de nado forzado en ratas (270 mg  $\text{Kg}^{-1}\text{día}^{-1}$ ; i.p.); sin embargo ninguno de ellos mostró actividad.

**SÁNCHEZ-MATEO et al., (2002, 2005, 2007 y 2009)** del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de La Laguna, España, en su trabajos **“Antidepressant effects of the methanol extract of several *Hypericum* species from the Canary Islands”**, **“Antidepressant properties of some *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum* Ait. extracts in the forced swimming test in mice”**, **“Antidepressant activity of some *Hypericum reflexum* L. fil. extracts in the forced swimming test in mice”** y **“*Hypericum***

***grandifolium* Choisy: A species native to Macaronesian Region with antidepressant effect** (“Efecto antidepresivo de los extractos metanólicos de varias especies de *Hypericum* de las Islas Canarias”, “Propiedades antidepresivas de algunos extractos del *Hypericum canariense* L., e *Hypericum glandulosum* Ait., en la prueba de natación forzada en ratones”, “Actividad antidepresiva de algunos extractos del *Hypericum reflexum* L. fil., en la prueba de natación forzada en ratones” e “*Hypericum grandifolium* Choisy: una especie nativa de la región macaronésica con actividad de tipo antidepresivo”) y

**BONKANKA et al., (2008)** del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de La Laguna, España, en su trabajo **“HPLC-MS Analysis and anti-oedematogenic activity of *Hypericum grandifolium* Choisy (Hypericaceae)”** (Análisis por HPLC-MS y actividad antiedematosa del *Hypericum grandifolium* Choisy (Hypericaceae)) reportan:

Se investigaron varios efectos neurofarmacológicos de los extractos metanólicos de las partes aéreas en floración del *H. canariense*, *H. glandulosum*, *H. grandifolium* e *H. reflexum* (*Hypericaceae*). Estos extractos no alteraron significativamente la actividad locomotora, la temperatura corporal ni el tiempo de sueño inducido por pentobarbital, con la excepción de *H. reflexum* que potenció significativamente el sueño inducido por pentobarbital a las dosis de 500 y 1000 mg/kg v.o., Además, no se observó actividad anticolinérgica ni relajante muscular. Estos extractos antagonizaron la ptosis y/o depresión motora inducida por tetrabenazina y también acortaron el tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada. Por otra parte, el *H. glandulosum* y los extractos de *H. grandifolium* a la dosis de 1000 mg/kg v.o., potenció las contracciones de cabeza inducidas por el 5-HTP. Estas observaciones sugieren que los extractos metanólicos de las especies de *Hypericum* a las dosis de 500 y 1000 mg/kg v.o., poseen actividad antidepresiva en ratones, sin inducir efectos significativos de relajación muscular, anticolinérgicos ni sedantes

La caracterización química de los extractos metanólicos utilizados ha revelado la presencia de flavonoides y antraquinonas en el *H. canariense*, *H. glandulosum* e *H. reflexum*. Por otro lado el extracto metanólico del *H. grandifolium* ha mostrado la presencia de los flavonoides quercetina, quercitrina e hiperósido, ausencia de antraquinonas y la presencia del floroglucinol hiperforina.

VIANA *et al.* (2005) del Programa de Pos-Graduación en Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Federal de Rio Grande del Sul, Porto Alegre, Brasil, en su investigación “**The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake**” (El efecto antidepresivo del *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) en la prueba de nado forzado resulta de una inhibición de la recaptación neuronal de monoaminas) reportan:

La acción sobre el sistema monoaminérgico, en especial sobre el dopaminérgico, del extracto crudo (ECH) y purificado (HCP) de ciclohexano del *Hypericum caprifoliatum* (PC) y de su principal derivado floroglucinol (HCL). Tanto el ECH como el HCP redujeron el tiempo de inmovilidad tanto de ratones como de ratas en la prueba de nado forzado observándose una relación dosis-dependiente. El efecto de la dosis más alta fue prevenida por la administración previa de sulpiride o SCH 23390 (Antagonistas de receptores D2 y D1 respectivamente). Además HCP y HCL inhibieron de un modo monofásico y dosis-dependiente la recaptación sinaptosomal de [<sup>3</sup>H]-DA, [<sup>3</sup>H]-NA, [<sup>3</sup>H]-5HT; pero no previnieron la unión de ligandos específicos a los transportadores de monoaminas. Estas pruebas sugieren que el efecto antidepresivo del HC en la prueba de nado forzado es debido a un incremento en la transmisión monoaminérgica, como resultado de la inhibición de la recaptación de monoaminas, lo cual podría estar relacionado a su contenido en floroglucinoles.

HAAS *et al.*, (2009 y 2010) del Programa de Pos-Graduación en Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Federal de Rio Grande del Sul, Porto Alegre, Brasil, en sus trabajos “**Phychopharmacological screening of Hyperoside, a flavonoid isolated from *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltl.**” y “**The anti-immobility effect of hyperoside on the forced swimming test in rats is mediated by the d2-like receptors activation**” (Cribado psicofarmacológico del hiperósido, un flavonoide aislado del *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltl y El efecto anti-inmovilidad del hiperósido en la prueba de natación forzada en ratas esta mediada por activación de receptores del tipo D2) indican:

Los extractos crudos de varias especies de *Hypericum* del sur del Brasil han mostrado efectos de tipo antidepresivo y analgésico en roedores. La

caracterización química de estas especies ha revelado que estos presentan una abundante cantidad de flavonoides y derivados del floro-glucinol. Se aisló el flavonoide hiperósido por técnicas cromatográficas. Los ratones tratados con dosis únicas de este flavonoide (10, 20 y 40 mg/kg) no presentaron signos de toxicidad y se observó un efecto de tipo antidepresivo (dosis de 10 y 20 mg/kg i.p. en ratones; 1.8 mg/kg/día en ratas) prevenible por la administración de sulpiride (50 mg/kg) un antagonista D2.

STEIN *et al.*, (2010) del Programa de Pos-Graduación en Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Federal de Rio Grande del Sul, Porto Alegre, Brasil, en su trabajo "***Hypericum polyanthemum* and its main phloroglucinol derivative uliginosin B present synergistic effect with different antidepressant drugs in the forced swimming test in mice**" (*Hypericum polyanthemum* y su principal derivado de floro-glucinol uliginosina B presentan efectos sinérgico con diferentes drogas antidepresivas en el test de natación forzada en ratones) reportan:

Del *H. polyanthemum* se han aislado floro-glucinoles diméricos y hasta la fecha se ha demostrado que la uliginosina B, presente en los extractos lipofílicos de esta especie vegetal, muestra actividad de tipo antidepresivo en roedores. También se ha demostrado que este efecto mostrado tanto por el extracto lipofílico como por la uliginosina B presentan un sinergismo con el sistema dopaminérgico, serotoninérgico y noradrenérgico en la prueba de natación forzada en ratones.

WANG *et al.*, (2010) de la Escuela de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Sun Yat-Sen, China, en su trabajo "**Chemical constituents and antidepressant activity of the new species *Hypericum enshiense* occurring in China**" (Constituyentes químicos y actividad antidepresiva de la nueva especie *Hypericum enshiense* espontáneo en China) reportan:

El *H. enshiense* es una nueva especie de *Hypericum* nativo de China. Se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo de los componentes químicos del extracto hidroalcohólico obtenido de esta especie por HPLC/DAD/ ESI-MS. Se identificaron tentativamente a la hipericina, pseudohipericina y flavonoides. Se investigó la actividad antidepresiva del extracto hidroalcohólico mediante la

prueba de natación forzada y la prueba de la suspensión de la cola. El extracto redujo significativamente el tiempo de inmovilidad en ambas pruebas a las dosis de 250 y 500 mg/kg y no alteró la actividad locomotora de los ratones que recibieron los diferentes tratamientos. Estos resultados sugieren que el extracto seco hidroalcohólico del *H. enshiense* posee potencial actividad antidepresiva, constituyéndose así en un nuevo recurso potencial para el desarrollo de drogas antidepresivas.

## **2.4 BASES TEÓRICO-CIENTÍFICAS**

### **2.4.1 DEPRESIÓN MENTAL Y ANTIDEPRESIVOS.**

#### **2.4.1A EL DESCUBRIMIENTO DE LOS ANTIDEPRESIVOS.**

El uso de fármacos para el tratamiento de los desordenes del estado del ánimo tiene una relativa corta historia y aún está en una fase de rápido desarrollo. Al igual que en muchas áreas de la psiquiatría, el proceso de desarrollo científico ha sido la continuación de observaciones casuales. Hasta 1952, los principales recursos terapéuticos para el control y el alivio de situaciones de depresión mental eran el coma insulínico, el electroshock, las famosas curvas de sueño y la psicoterapia. Dentro de los recursos farmacológicos sólo se contaba con algunas preparaciones no específicas como el nitrito malónico y el ácido láctico, los cuales presentaban resultados insatisfactorios. Sin embargo en esta década se puso de manifiesto que la iproniazida, fármaco pensado y utilizado inicialmente como tuberculostático, elevaba el estado de ánimo de los pacientes que recibían dicha medicación. Este hecho, inicialmente reportado como un efecto adverso, fue posteriormente desarrollado como un efecto principal gracias al esfuerzo de múltiples estudios clínicos. Independientemente, en 1952, Albert Zeller observó que la iproniazida inhibía a la MAO. De esta manera se correlacionó la inhibición de la MAO por la iproniazida con su capacidad antidepresiva (NASH y NUTT, 2004; NASH y NUTT, 2007; LÓPEZ-MUÑOZ *et al.*, 2007).

La serendipia también tuvo un papel fundamental en el desarrollo de la imipramina, concebido inicialmente como neuroléptico, en el que se observó una actividad antihistamínica débil y acciones anticolinérgicas pronunciadas.

En humanos normales la imipramina producía un efecto sedante, todo ello, unido a un espectro de actividad psicofarmacológico confuso en animales hubiera hecho clasificar a este compuesto como un tranquilizante débil. Sin embargo, gracias un informe de Roland Kuhn, relativo a resultados sobre 500 pacientes, la imipramina pasó a convertirse en la piedra angular del tratamiento de la depresión mental. Los mejores resultados terapéuticos, de acuerdo con el informe, con recuperación social total del paciente, se refería a depresiones endógenas con los síntomas característicos de retraso motor y mental. Posteriormente a inicios de los 1960 se planteó que la Imipramina y la iproniazida podían tener un común denominador en sus mecanismos de acción. De hecho se demostró que ambos revertían los efectos depresores de la reserpina e además parecían incrementaban la concentración de 5-HT y catecolaminas en la hendidura sináptica por mecanismos distintos. Una vez que la farmacología de estos agentes fue completamente compendiada, se desarrollaron nuevos agentes con acciones específicas en sistemas principales de neurotransmisión, principalmente los ISRS. Los nuevos fármacos se toleran mejor, sin embargo no son necesariamente más efectivos que sus predecesores (KUHN, 1959; PLETSCHER, 1991; NASH y NUTT, 2004; NASH y NUTT, 2007; LÓPEZ-MUÑOZ y ALAMO, 2009).

#### **2.4.1B LA HIPÓTESIS MONOAMINÉRGICA DE LA DEPRESIÓN.**

La "hipótesis monoaminérgica" de la depresión, la cual envuelve imbalances en la función serotoninérgica, noradrenérgica y posiblemente dopaminérgica, ha dominado las nociones y explicaciones de la fisiopatología de la depresión desde el descubrimiento empírico de las propiedades antidepresivas de los IMAO y tricíclicos hace 50 años atrás. A pesar de que los neurotransmisores monomaminérgicos (5-HT, NA y DP) están indudablemente involucrados, se reconoce ahora que los cambios en los niveles de monoaminas producido por los antidepresivos y subsecuentes procesos adaptativos, en particular un cambio en la sensibilidad de alguno de sus receptores, no son suficientes para explicar el mecanismo de acción de los antidepresivos. De hecho es difícil correlacionar el tiempo de latencia de la actividad antidepresiva (3-6 semanas) con el incremento de los niveles de

monoaminas en la sinapsis, ya que estos cambio ocurren inmediatamente después de la dosis inicial del fármaco (LÓPEZ-MUÑOZ *et al.*, 2007; LÓPEZ-MUÑOZ y ALAMO, 2009).

#### **2.4.1C OTRAS HIPÓTESIS.**

En los últimos 50 años, el número de hipótesis del mecanismo de acción de los antidepresivos ha crecido de manera constante. Altas concentraciones de glucocorticoides están generalmente asociadas con efectos negativos en el estado de ánimo, como también, con cambios estructurales en el hipocampo, tal vez mediante la reducción de la síntesis del BDNF, por la liberación excesiva de ácido glutámico y/o una reducción en la captación de glucosa neuronal. De acuerdo con estas observaciones, los inhibidores de la síntesis de glucocorticoides y antagonistas de receptores glucocorticoides exhiben propiedades de tipo antidepresivo (KASPER y HAMON, 2009).

Por otro lado, existe también interés en tratar los desordenes de depresión por medio de la modulación de las acciones de los neuropéptidos. De hecho, se ha afirmado que los antagonistas de receptores NK1 de la sustancia P ejercen efectos del tipo antidepresivo tanto en modelos animales como en ensayos clínicos. Sin embargo, este abordaje no ha resultado en un antidepresivo clínicamente efectivo puesto que los resultados de estudios posteriores no han sido fáciles de interpretar (KASPER y HAMON, 2009).

Las anormalidades funcionales del axis HPA también podrían estar relacionada con desordenes afectivos. De hecho numerosos estudios han demostrado niveles elevados de CFR en el fluido cerebroespinal de pacientes con depresión moderada a severa. La administración de antagonistas en los receptores CRF-1 ha demostrado contrarrestar los déficits conductuales en modelos animales de depresión y mejorar el estado de ánimo en pacientes depresivos. Sin embargo, al menos para los antagonistas de receptores CRF1 y NK1, se puede especular que ellos también actúan, aunque de forma indirecta, a través del mecanismo monoaminérgico. De hecho, los antagonistas de receptores NK1 activan vías noradrenérgicas y dopaminérgicas que inervan el hipocampo y la corteza frontal, y los tratamientos a largo plazo con estos antagonistas producen cambios adaptativos en la neurotransmisión

serotoninérgica (notablemente una desensibilización de autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub>) comparable con aquellos observados después del tratamiento con IMAOs o ISRSs. Adicionalmente, los antagonistas de receptores CRF-1 aumentan indirectamente la actividad de las vías serotoninérgica (KASPER y HAMON, 2009).

El estrés causa una inducción (mediado por una proteína denominada CREB) del péptido opioide dinorfina en el núcleo acubens, lo cual, por otro lado, puede causar ciertas conductas del tipo depresivo. Así, la administración de antagonistas de dinorfina, sistemática o localmente en el núcleo acubens, ha mostrado disminuir conductas de tipo depresivo en roedores. La manipulación de receptores cannabinoides CB1, los principales receptores de cannabinoides en el cerebro, a través de agonistas o antagonistas de receptores CB1 también ejerce efectos en conductas relacionadas con el estrés en roedores, a pesare que los resultados obtenidos aun son inconsistentes (KASPER y HAMON, 2009).

#### **2.4.1D TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS ACTUALES DE LA DEPRESIÓN.**

La depresión es una enfermedad crónica, recurrente y potencialmente fatal que afecta a más del 20% de la población en el mundo. Es una de las 10 causas principales de morbilidad y mortalidad en el mundo según la OMS. Es altamente heredable con aproximadamente un 40-50% de riesgo genético, sin embargo los genes que envuelven este riesgo aun no han sido completamente identificados. El riesgo restante 50-60% aun es pobremente definido. Se sugiere que los traumas en los primeros años de vida, el estrés emocional, las enfermedades físicas y aun las infecciones virales podrían estar involucrados. Muchos expertos concuerdan en que la depresión debe ser vista como un síndrome y no como una enfermedad. Por lo tanto, las complicaciones altamente variables de los síntomas usados para definir la depresión, y el curso altamente variable de la enfermedad y su respuesta a varios tratamientos, indican que la depresión subsume numerosos estados de enfermedad de distinta etiología y quizá de distinta fisiopatología (BERTON y NESTLER, 2006).

A pesar de la relativa falta de conocimiento de la etiología y la fisiopatología de la depresión, existen buenos tratamientos. La depresión leve responde a las diferentes formas de psicoterapia. Las Leves y más graves formas de depresión responden a una gran cantidad de medicamentos antidepresivos, en estos casos la combinación de medicación y psicoterapia proporciona un óptimo tratamiento. La terapia electroconvulsiva es uno de los tratamientos más efectivos para la depresión, pero es generalmente reservada para los casos más graves debido a la disponibilidad de numerosos tratamientos farmacológicos. La utilidad de otros tratamientos, llamados somáticos está siendo investigada (BERTON y NESTLER, 2006).

**TABLA N°3.** Criterios diagnósticos para la depresión mayor según el DSM-IV.

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS EPISODIO DEPRESIVO MAYOR SEGÚN DSM-IV
(1) Estado de ánimo depresivo la mayor parte del día, casi todos los días, indicado por el relato subjetivo o por observación de otros.
(2) Marcada disminución del interés o del placer en todas, o casi todas, las actividades durante la mayor parte del día, casi todos los días.
(3) Pérdida significativa de peso sin estar a dieta o aumento significativo, o disminución o aumento del apetito casi todos los días.
(4) Insomnio o hipersomnia casi todos los días.
(5) Agitación o retraso psicomotores casi todos los días.
(6) Fatiga o pérdida de energía casi todos los días.
(7) Sentimientos de desvalorización o de culpa excesiva o inapropiada (que pueden ser delirantes) casi todos los días (no simplemente autorreproches o culpa por estar enfermo).
(8) Menor capacidad de pensar o concentrarse, o indecisión casi todos los días (indicada por el relato subjetivo o por observación de otros).
(9) Pensamientos recurrentes de muerte (no sólo temor de morir), ideación suicida recurrente sin plan específico o un intento de suicidio o un plan de suicidio específico.
La depresión (oficialmente depresión mayor) es diagnosticada de acuerdo a los criterios del Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales IV (DSM-IV), el cual define un "episodio depresivo mayor" como aquel caracterizado por lo menos por cinco de los síntomas enumerados anteriormente. Cada uno debe ser evidente diariamente o al menos cada día por dos semanas. La severidad es juzgada como leve, moderada o severa, basada en el grado de deterioro de la actividad diaria, laboral y social

FUENTE: BERTON y NESTLER, 2006.

**TABLA N°2. Tratamiento antidepresivos actualmente disponibles.**

<b>TIPO DE TRATAMIENTO</b>	<b>MECANISMO DE ACCIÓN</b>	<b>EJEMPLOS</b>
<b>Farmacológicos</b>  Tricíclicos  ISRS  IRN  IRSN  IMAO  Litio   Antidepresivos atípicos	Inhibición combinada de la recaptación de 5-HT y NA.  Inhibición selectiva de la recaptación de 5-HT.  Inhibición selectiva de la captación de NA.  Inhibición combinada de la recaptación de 5-HT y NA.  Inhibición de la MAO-A, Inhibición de la MAO-B no tiene efecto antidepresivo.  Muchas acciones moleculares, inhibición de fosfatasas fosfatidilinositol, Adenilato ciclase, etc., se desconoce cuál de ellas es la responsable de sus propiedades antimaníacas y antidepresivas  Desconocido. Sin embargo se han propuesto mecanismos basados en monoaminas.	Imipramina, amitriptilina  Fluoxetina, citalopram  Atomexetina, reboxetina  Venlafaxine, duloxetina  Tranilcipromina, fenelzina   Brupopión, mirtazapina, tianeptina
<b>No farmacológicos</b>  Terapia Electroconvulsiva  Estimulación magnética  Estimulación vagal  Psicoterapia	Estimulación general del cerebro.  Estimulación general del cerebro.  Desconocido.  Desconocido, pero se piensa que implican el aprender nuevas maneras de hacer frente a los problemas.	

**FUENTE:** BERTON y NESTLER, 2006.

Casi todos los medicamentos disponibles se basan en descubrimientos casuales que se hicieron hace más de medio siglo. La mayoría se desarrollaron en base a los antidepresivos tricíclicos, que se cree que actúa mediante la

inhibición de los transportadores de la membrana plasmática de la serotonina y/o noradrenalina. Estos medicamentos antiguos proporcionaron un modelo para el desarrollo de nuevas clases de antidepresivos, incluyendo los ISRS, IRN e IRSN. Sin embargo, como estos medicamentos más nuevos tienen el mismo mecanismo de acción de los tricíclicos, su eficacia intrínseca y la variedad de pacientes en los que el tratamiento tiene éxito siguen siendo los mismos. Los más antiguos IMAO, que reducen la degradación enzimática de la 5-HT y NA, también se siguen utilizando hoy en día con gran éxito. El conocimiento de los mecanismos agudos de acción de estos fármacos condujo a la creencia general de que todos los medicamentos antidepresivos eficaces actúan mediante el aumento de la actividad del sistema serotoninérgico o noradrenérgicos del cerebro. Sin embargo, todos estos medicamentos se deben administrar durante al menos varias semanas para que sus acciones antidepresivas se manifiesten. A pesar de varias décadas de investigación, los cambios que inducen las drogas antidepresivas en el cerebro aun no están claros (BERTON y NESTLER, 2006).

Aunque los tratamientos actuales para la depresión son generalmente seguros y eficaces, están lejos de ser el ideal. Además de la necesidad de administrar los medicamentos durante semanas o meses para ver los beneficios clínicos, los efectos secundarios siguen siendo un problema grave, incluso con los medicamentos más nuevos. Y, lo más importante, menos del 50% de los pacientes con depresión presentan una remisión completa con el tratamiento optimizado, con o sin psicoterapia concomitante. Por lo tanto todavía hay una gran necesidad de tratamientos para la depresión, de acción más rápida, más seguras y más efectivas (BERTON y NESTLER, 2006).

## **2.4.2 MODELOS ANIMALES DE DEPRESIÓN.**

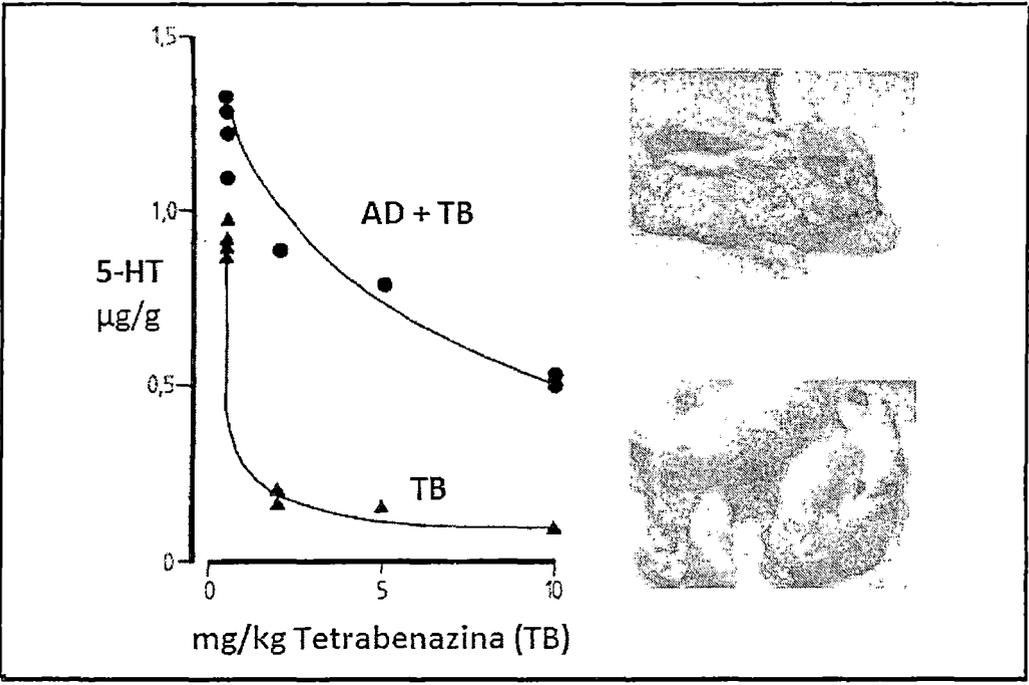
### **2.4.2.A MODELOS FARMACOLÓGICOS DE DEPRESIÓN.**

Los primeros modelos farmacológicos de actividad antidepresiva han tenido un impacto significativo en el establecimiento de la teoría monoaminérgica de la depresión, que supone, así, que la elevación de los niveles de la 5-HT y la NA mejorará la sintomatología depresiva. Estos modelos ofrecen una buena validez predictiva en cuanto a actividad antidepresiva

basada en monoaminas, si bien la sintomatología de la depresión no es la base de este modelo (DEUSSING, 2006).

Dentro de los primeros modelos farmacológicos desarrollados para el cribado de nuevos fármacos antidepresivos se tienen a las pruebas de antagonismo farmacológico. La reserpina, un fármaco antihipertensivo y antipsicóticos, y la tetrabenazina son capaces de agotar, no selectivamente, las monoaminas cerebrales y por lo tanto inducen un síndrome de hipomotilidad del aparato locomotor, ptosis y reducen la temperatura corporal en roedores. Este modelo se basa en la capacidad de los antidepresivos para revertir los efectos inhibitorios sobre la motilidad, la ptosis y la temperatura corporal de la reserpina y la tetrabenazina en ratas, ratones y conejos. Otras pruebas farmacológicas actualmente utilizadas en el cribado de drogas antidepresivas incluye el antagonismo de la hipotermia inducida por apomorfina y la potenciación de las estereotipias inducidas por la administración de 5-hidroxitriptofano (PLETSCHER, 1991; DEUSSING, 2006; SÁNCHEZ-MATEO *et al.*, 2009).

**FIGURA N°19.** Curvas de contenido de 5-HT (en mg/g) en cerebro de conejo: 1 hora después de la administración i.p. de varias dosis de tetrabenazina (TB) antes (abajo) y después (arriba) de la administración i.p. de un antidepresivo. En los animales pretratados se atenúa la disminución de 5HT cerebral. Imágenes: 1 h después de la inyección de TB (abajo) y después (arriba) antes del tratamiento con antidepresivo.

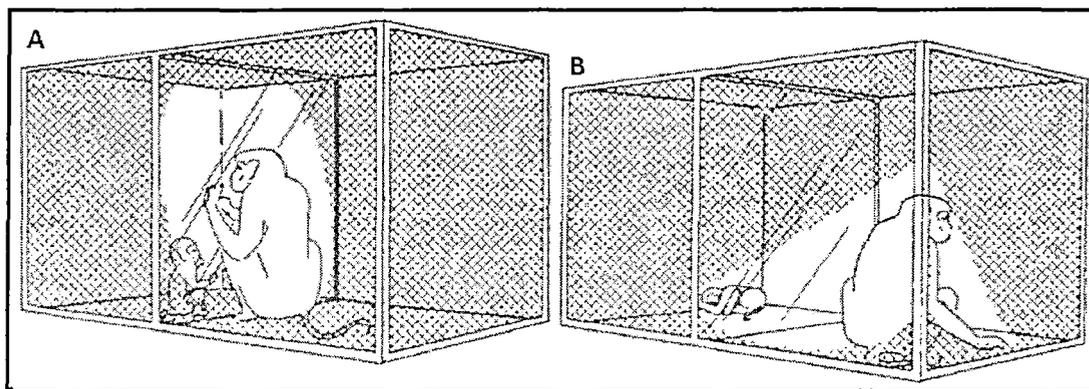


FUENTE: PLETSCHER, 1991.

## 2.4.2B MODELOS CONDUCTUALES DE DEPRESIÓN: ESTRÉS DE INFANCIA TEMPRANA.

Por otro lado, las experiencias traumáticas en los inicios de la vida, como los acontecimientos traumáticos en la infancia, resultan en una mayor sensibilidad a los efectos del estrés más tarde en la vida e influyen en la vulnerabilidad individual a los trastornos psiquiátricos relacionados con el estrés y la depresión. En un intento de reproducir la sintomatología de la depresión en animales, se han desarrollado los denominados modelos de estrés de infancia temprana. Dentro de estos el modelo más utilizado es el paradigma de separación materna en la que las crías se separan de su progenitora por un periodo de 1-24 h por día, durante las dos primeras semanas postnatales. La separación materna resulta en un aumento de comportamientos del tipo ansioso y depresivo y una elevada respuesta del axis HPA en la edad adulta. Si bien la naturaleza exacta de los efectos psicológicos de la separación materna después del parto, no se conoce del todo, el paradigma apoya la utilidad de los modelos animales para el estudio de las bases neurobiológicas de los efectos del estrés en la vida temprana sobre las emociones y el comportamiento relacionado con la recompensa. Los paradigmas de la separación materna fueron inicialmente observados en primates, sin embargo en la actualidad los roedores ofrecen grandes ventajas como es la posibilidad de obtener un elevado número de crías y la facilidad de mantenerlos bajo condiciones estándares de laboratorio (AKISKAL y McKINNEY, 1973; DEUSSING, 2006).

FIGURA N°20. Paradigma de separación materna en primates.

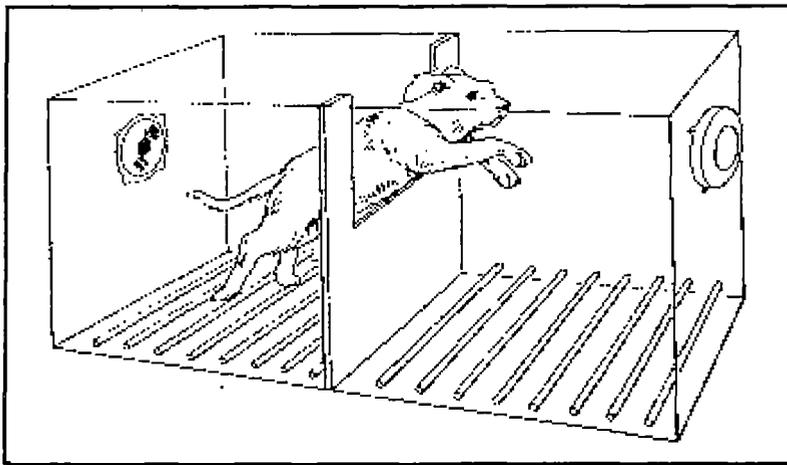


FUENTE: AKISKAL y McKINNEY, 1973.

## 2.4.2C MODELOS CONDUCTUALES DE DEPRESIÓN: LA INDEFENSIÓN APRENDIDA.

En la universidad de Harvard por el año de 1948, Mowrer estudiaba el efecto de las descargas eléctricas sobre el desarrollo de conductas de escape en animales. Se observó que los perros aprendían la conducta con relativa facilidad. En algunos experimentos los animales no intentaban escapar sino que soportaba las descargas. Esto llevó al estudio de la indefensión. En base a estos estudios **OVERMIER y SELIGMAN, 1967** y **SELIGMAN y MAIER, 1967** realizaron una serie de experimentos de laboratorio con perros a los que exponían a shocks eléctricos inescapables o inevitables, posteriormente, 24 horas más tarde, estos animales eran sometidos a una tarea de aprendizaje de conductas de escape/evitación en una caja de salto. La respuesta que se exigía a los perros consistía en saltar de un compartimiento a otro de la caja de salto, para evitar o escapar de la estimulación aversiva (**OVERMIER y SELIGMAN, 1967; SELIGMAN y MAIER, 1967; SELIGMAN 1972**).

FIGURA N°21. Caja de salto utilizado en los experimentos de Seligman.



FUENTE: Adaptación.

Los resultados obtenidos indicaron que los perros sometidos a shocks eléctricos ineludibles, mostraban graves deterioros en el aprendizaje de nuevas conductas de escape. Además estos animales después de los primeros ensayos, no hicieron ningún movimiento para escapar, aguantando pasivamente los shocks eléctricos. Así se propuso el fenómeno de la indefensión aprendida (*learned helplessness*). La indefensión aprendida, como

un término técnico en la psicología animal y la psicología humana, significa una condición en la que un ser humano o animal ha aprendido a comportarse con impotencia, incluso cuando la oportunidad de evitar una circunstancia desagradable o dañina a la que ha sido sometido se restablece. Así la teoría de la indefensión aprendida es una visión de que la depresión clínica y enfermedades mentales relacionadas se originan de la percepción de la ausencia de control sobre el resultado de una situación (SELIGMAN 1972).

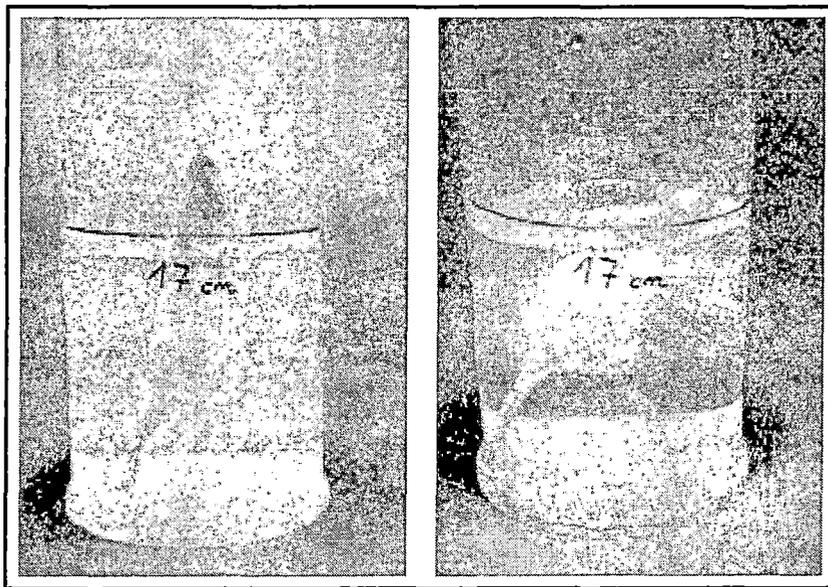
#### **2.4.2C MODELOS CONDUCTUALES DE DEPRESIÓN: LA PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA.**

En el año 1957 Synthelabo (Paris, Francia) contrató a Roger Porsolt como farmacólogo conductual para desarrollar modelos animales de memoria, ansiedad y depresión. En el departamento de neurofarmacología fue abordado por las publicaciones de Seligman. A pesar del escepticismo de Porsolt con respecto a los resultados obtenidos por Seligman, su grupo de trabajo observó que durante el desarrollo de algunos experimentos de aprendizaje en un laberinto de agua algunas ratas después de explorar un poco simplemente dejaban de nadar y se quedaban inmóviles o sólo realizaban movimientos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua. Pensando en los experimentos de Seligman, se planteó que estas ratas pudieran haber "pensado" que no había salida, y por lo tanto habían perdido la esperanza y se habían resignado a la situación aversiva aparentemente ineludible. Este es el origen del a prueba de natación forzada (**This Week's Citation Classic® con respecto a PORSOLT *et al.*, 1977a**).

Aun con escepticismo se probaron drogas antidepresivas como la imipramina y derivados. Para sorpresa de todos estos fármacos reducían claramente la duración de la inmovilidad a dosis que eran claramente sedantes. Posteriormente se ensayaron también algunos compuestos atípicos (mianserina e iprindol) y la terapia electroconvulsiva, los cuales eran considerados como falsos negativos en los test de actividad antidepresiva disponibles (por ejemplo el test de antagonismo de la reserpina) (**PORSOLT *et al.*, 1977<sup>a</sup>; PORSOLT *et al.*, 1977<sup>b</sup>**).

Los resultados positivos encontrados llevaron a la preparación del primer artículo publicado en la revista *Narute*, divulgando así el nuevo método de cribado de drogas antidepresivas comúnmente conocido como prueba de natación forzaba (*forced swimming test*) o prueba de Porsolt. Publicaciones posteriores presentan la versión de la misma prueba utilizando ratones, con modificaciones menores y explican con detalle el método utilizando ratas de diferentes cepas (PORSOLT *et al.*, 1978a; PORSOLT *et al.*, 1978b). Desde entonces la prueba de natación forzada se ha convertido en un ensayo de actividad antidepresiva estándar en los laboratorios farmacéuticos de todo el mundo.

**FIGURA N°22.** Prueba de natación forzada en ratas, modelo final de Porsolt. Se puede apreciar las conductas típicas de movimiento (izquierda) y de inmovilidad (derecha).

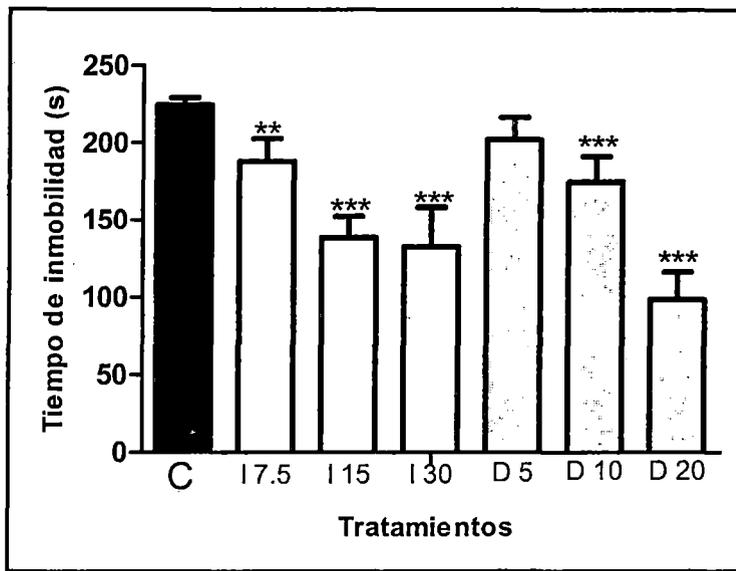


**FUENTE:** BUTTERWECK y NAHRSTEDT, 2003.

Esta prueba es también utilizada por laboratorios académicos como un modelo animal simple para la investigación de la neurobiología de la depresión y la acción de las drogas antidepresivas. Las razones para su aceptación son, probablemente, la sencillez del procedimiento y su alta reproducibilidad. También respondió a la necesidad de una nueva metodología en un momento en que los métodos disponibles eran criticados por presentar falsos negativos. Aunque existe un debate considerable acerca de su relevancia con respecto a la depresión se estima que el método es sensible a 87 y 94 por ciento de los antidepresivos clínicamente conocidos en la rata y el ratón, respectivamente. Por lo tanto, la prueba de natación forzada representa una herramienta útil en

la selección de medicamentos con potencial actividad antidepresiva (BORSINI y MELI, 1988).

FIGURA N°23. Curva dosis respuesta de imipramina (I) y desipramina (D): a las dosis de 7.5, 15, 30 y 5, 10, 20 mg/kg de peso respectivamente. \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$  comparados con el grupo control (C).



FUENTE: Adaptado de PORSOLT *et al.*, 1977a.

### 2.4.3 TOXICIDAD AGUDA.

Conocer la toxicidad de un producto químico industrial, pesticida, aditivo alimenticio y producto farmacéutico, es necesario para que estos sean evaluados adecuadamente y así sean manejados, transportados y usados convenientemente. En particular, la información de la toxicidad aguda de un compuesto químico es requerida como uno de los criterios básicos para evaluar su seguridad. Los valores de  $DL_{50}$  son generalmente usados como índices de toxicidad aguda y son solicitados por las autoridades regulatorias de muchos países, en lo que concierne al registro de fármacos, aditivos alimenticios, pesticidas y sustancia químicas nuevas (YAMANAKA *et al.*, 1990).

Sin embargo, se ha reportado que los valores de  $DL_{50}$  no deberían ser necesariamente requeridos para la evaluación de la toxicidad aguda de las sustancias químicas por las siguientes razones. Primero, los valores de  $DL_{50}$  obtenidos, incluso sacrificando un gran número de animales, varían entre laboratorios distintos. Segundo, existe una tendencia a reducir el uso despilarrado de animales de laboratorio. Otras técnicas plantean el uso de

invertebrados, cultivos tisulares, etc., para reemplazar los test de toxicidad aguda con mamíferos, pero en la actualidad estas técnicas no son completamente satisfactorias (YAMANAKA *et al.*, 1990).

### 2.4.3A LA DL<sub>50</sub> COMO CONSTANTE BIOLÓGICA.

La investigación de la toxicidad aguda es el primer paso en la investigación toxicológica de una sustancia desconocida. El índice de la toxicidad aguda es la DL<sub>50</sub>. Sin embargo, la DL<sub>50</sub> no debe ser considerada como una constante biológica, debido a que se obtienen resultados distintos al realizar repeticiones o cuando las determinaciones son llevadas a cabo en diferentes laboratorios. Este hecho ya ha sido muy claramente mostrado en un estudio multi-centro llevado a cabo en la Comunidad Europea con cinco sustancias por Hunter y Lingk en 1978 (LORKE, 1983). En este estudio los valores de DL<sub>50</sub> variaron como se muestra en la siguiente tabla:

**TABLA N°5.** Valores de DL<sub>50</sub> de cinco compuestos estudiados por Hunter y Lingk.

COMPUESTO	DL <sub>50</sub> mg/kg	RADIO DEL VALOR MÁS ALTO AL MÁS PEQUEÑO
I	46- 522	11.3
II	800-4,150	5.2
III	350-1,280	3.7
IV	805-5,420	6.7
V	70- 513	7.3

FUENTE: LORKE, 1983.

Otros ejemplos, que muestran que los valores de DL<sub>50</sub> no pueden ser considerados como constantes biológicas, han sido investigados por Zbinden y Flury-Roversi en 1981. La conclusión que debemos mencionar de estos resultados es que es imposible en principio especificar un valor de DL<sub>50</sub> para una sustancia el cual es al mismo tiempo sea válido y exacto (LORKE, 1983). Por lo tanto:

¿Por qué son tantos animales sacrificados por el único propósito de determinar el valor de DL<sub>50</sub> con alta precisión, si es imposible en principio determinar una DL<sub>50</sub> válida y reproducible?

### 2.4.3B EL DESARROLLO HISTÓRICO DE LOS TEST DE DL<sub>50</sub>.

En un esfuerzo de determinar la toxicidad aguda de una sustancia se buscó un medio simple de graduar los efectos tóxicos agudos. Es así que se deseaba tener un test con el cual fuera posible determinar si una sustancia química era muy tóxica, tóxica, poco tóxica, o si los efectos tóxicos no eran significativos como para preocuparse en la práctica. Con este objetivo se avizoró una figura que expresara los efectos dañinos de cualquier sustancia, se intentó con esta figura indicar la cantidad de sustancia con capacidad injuriosa después de un modo de administración específico. Debido a que el término injuria o daño siempre envuelve un alto grado de subjetividad, se seleccionó un criterio objetivo, llamado muerte. Así, se buscó una manera de determinar la probabilidad de muerte lo más exacta posible. Es así que la DL<sub>50</sub> fue reconocida y justificada como el mejor parámetro. Desafortunadamente, esto ha conducido a describir como similares la determinación de la DL<sub>50</sub> con la investigación de la toxicidad aguda (LORKE, 1983).

La investigación científica de la toxicidad es necesaria y desde muchos puntos de vista de gran valor. Sin embargo es engañoso igualar la determinación de la toxicidad aguda con el de la DL<sub>50</sub> a pesar de que esto generalmente ocurre. Debido a estos desacuerdos es que varios métodos estadísticos y matemáticos han sido desarrollados para estimar la DL<sub>50</sub> y sus rangos de variación con el fin de reportar la toxicidad aguda con la mayor precisión posible, justificada por métodos matemático-estadísticos. Los métodos matemático-estadísticos más empleados en la determinación de la DL<sub>50</sub> son el método gráfico de Litchfield y Wilcoxon (1949), el método de papel cuadriculado logarítmico de probit de Miller y Trainter (1944), y el procedimiento de hallazgo del intervalo o rango de Weil (1952). Todos estos métodos requieren un considerable número de animales con la finalidad de calcular una DL<sub>50</sub>, e, implícito en sus diseños matemáticos es que usando más animales se incrementa la precisión de los datos reportados (LORKE, 1983). Mas, aun si la DL<sub>50</sub> pudiera ser medida exactamente y con reproductibilidad, el conocimiento de su valor numérico preciso sería difícilmente de importancia práctica, porque la interpolación desde el animal de experimentación hacia el humano es difícilmente posible. Por otro lado, el conocimiento de los signos de

intoxicación, órganos diana de toxicidad aguda, reversibilidad de las lesiones etc., son de gran interés, y esta información puede ser obtenida de estudios cuidadosos con un pequeño número de animales (LORKE, 1983).

#### **2.4.3C EL MÉTODO DE LORKE PARA LA DETERMINACIÓN DE DL<sub>50</sub>.**

El método de Lorke describe un método para la investigación de la toxicidad aguda de una sustancia desconocida, con la determinación de la DL<sub>50</sub>. Usando este método es posible obtener con un mínimo número de animales (se ha validado la metodología para hacer uso de un mínimo de 13 animales para determinar la DL<sub>50</sub> de una sustancia) de experimentación información adecuada de la toxicidad aguda y de la DL<sub>50</sub>. Este método no presenta limitaciones y es aplicable a fármacos y sustancias de la agricultura e industria. Este método también puede usarse por todas las vías de administración (LORKE, 1983; DÉCIGA-CAMPOS *et al.*, 2007).

Este método propone la determinación de toxicidad aguda en dos pasos. Además está basada en la suposición de que la sustancia química a ser investigada es completamente desconocida y que la investigación será llevada con un número mínimo de animales experimentales. Inicialmente es necesario determinar el rango aproximado de toxicidad aguda. Esto se logra administrando dosis diferentes al animal, por ejemplo 10, 100 y 1000 mg/kg por vía oral. Los resultados muestran si una sustancia es muy tóxica, tóxica, poco tóxica, o débilmente tóxica. Para esta primera fase se deben utilizar tres animales por cada nivel de dosis. El resultado de esta primera etapa es utilizado para determinar las dosis subsecuentes. Se tienen los siguientes postulados con respecto a los programas de administración subsecuentes para la determinación de la DL<sub>50</sub> (LORKE, 1983; DÉCIGA-CAMPOS *et al.*, 2007):

1. Las sustancias más tóxicas que 1 mg/kg son altamente tóxicas de tal modo que no es importante determinar la DL<sub>50</sub> exactamente.
2. Los valores de DL<sub>50</sub> mayores a 5,000 mg/kg no son de interés práctico.
3. Un valor aproximado de la DL<sub>50</sub> es usualmente adecuado para estimar el riesgo de intoxicación aguda.

Basado en estas consideraciones y en experiencias prácticas se tiene la siguiente tabla, utilizada para determinar las nuevas dosis en el segundo test en el que cada grupo está formado por un único ratón.

**TABLA N°6.** Tabla para determinar las nuevas dosis en el segundo test de Lorke. \* Número de animales que mueren/número de animales usados, \*\* Los resultados del primer test son considerados para estas dosis.

Dosis en mg/kg			Dosis escogidas para el segundo test			
Resultados de la investigación inicial						
10	100	1,000				
0/3*	0/3	0/3	1,600 2,900 5,000			
0/3	0/3	1/3	600	1,000**	1,600	2,900
0/3	0/3	2/3	200	400	800	1,600
0/3	0/3	3/3	140	225	370	600
0/3	1/3	3/3	50	100**	200	400
0/3	2/3	3/3	20	40	80	160
0/3	3/3	3/3	15	25	40	60
1/3	3/3	3/3	5	10**	20	40
2/3	3/3	3/3	2	4	8	16
3/3	3/3	3/3	1	2	4	8

FUENTE: LORKE, 1983.

**TABLA N°7.** Grados de toxicidad de una sustancia según valores de DL<sub>50</sub>.

DL <sub>50</sub> (mg/kg)		GRADO DE TOXICIDAD
Menor a	10	Altamente tóxica
Entre	10-100	Tóxica
Entre	100-1000	Poco tóxica
Mayor a	1000	Atóxica

FUENTE: Adaptado de LORKE, 1983.

La DL<sub>50</sub> se determina de la siguiente manera: se obtiene el promedio geométrico de las dosis para las cuales se encuentre 0/1 y 1/1 muertes de manera subsecuente en la segunda prueba. Ejemplo:

**TABLA N°8.** Determinación de la DL<sub>50</sub> del KCN en ratas según el método de Lorke.

Sustancia	PRIMERA FASE		SEGUNDA FASE	
	Dosis (mg/kg)	Mortalidad	Dosis (mg/kg)	Mortalidad
KCN	10	3/3	1	0/1
	100	3/3	2	0/1
	1000	3/3	4	0/1
			8	1/1
DL <sub>50</sub> para el KCN = (4+8)/2 = 6 mg/kg				

FUENTE: LORKE, 1983.

### **2.4.3D TEST DE IRWIN.**

Existen numerosas pruebas para determinar los efectos generales de un fármaco con actividad en el SCN y sobre la función fisiológica. Dentro de estos se encuentran el procedimiento de observación primaria originalmente descrito por Irwin, 1968 y la batería de observación funcional descrito por Moser *et al.*, 1995. El test de Irwin puede ser usado para estimar la dosis letal mínima de una sustancia o fármaco en desarrollo, las dosis que generaran respuesta sobre el SCN, y principalmente, para evaluar los efectos primarios sobre la conducta y funciones fisiológicas ocasionadas por la administración de esta sustancia a una dosis y vía de administración específicas. Los resultados de esta prueba son usados para predecir actividad terapéutica potencial y para seleccionar dosis para ensayos posteriores de eficacia (IRWIN, 1968; ROUX *et al.*, 2003).

Para el procedimiento del test de Irwin, se administra la sustancia de prueba a ratas o ratones, y después estos son observados durante las siguientes horas y en el próximo día. En los animales se observan conductas especialmente relacionadas con neurotoxicidad, como excitación, cola de Straub, saltos, hipersensibilidad a estímulos externos, estereotipia, y conducta agresiva, y para conductas relacionadas a depresión del SNC, como sedación, pérdida del balance, pérdida de la tracción, incoordinación motora, hiposensibilidad a estímulos externos, disminución del tono muscular, acinesia, catalepsia e hipotermia. Los efectos en la función autonómica, como respiración, diámetro de las pupilas, temperatura corporal, salivación y defecación, son también evaluados (IRWIN, 1968; ROUX *et al.*, 2003).

# **CAPÍTULO III**

# **MATERIALES Y**

# **MÉTODOS**

### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

#### 3.1.1 MUESTRA VEGETAL.

Se colectaron las partes aéreas en floración (tallos, hojas y flores y frutos) de cuatro especies de *Hypericum*. Se solicitó el permiso correspondiente de la Dirección General Forestal y de Fauna Silvestre (**ANEXO 1**).

***Hypericum andinum* Gleason.** Colectado en los alrededores del centro poblado menor de Amparaes (altura: 3432 m.s.n.m; coordenadas geográficas: S 13° 02' 34.0" WO 71° 56' 26.8"), distrito de Calca, provincia de Calca.

***Hypericum brevistylum* Choysi.** Colectado en los alrededores del centro poblado de Paqchaq (altura: 3573 m.s.n.m; coordenadas geográficas: S 13° 14' 50.4" WO 72° 06' 56.7"), distrito de Urubamba, provincia de Urubamba.

***Hypericum laricifolium* Juss.** Colectado en los alrededores del complejo arqueológico del Cumbe Mayo (altura: no determinada; coordenadas geográficas: no determinadas), distrito de Cajamarca, provincia de Cajamarca.

***Hypericum silenoides* Juss.** Colectado en los alrededores del centro poblado de Pumahuanca (altura: 3189 m.s.n.m; coordenadas geográficas: S 13° 16' 10.3" WO 72° 07' 41.5"), distrito de Urubamba, provincia de Urubamba.

***Hypericum struthiolifolium* Juss.** Se recibió una gentil cantidad de hojas y flores (aprox. 2g) del Herbario Vargas de la Facultad de Ciencias Biológicas.

**3.1.1A CRITERIOS DE INCLUSIÓN:** Partes aéreas en floración del *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium* e *H. silenoides* en buen estado de conservación.

**3.1.1B CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:** Partes aéreas en floración del *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium* e *H. silenoides* que presenten signos de deterioro.

### **3.1.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.**

Ratones machos Balb/c/CNPB provenientes del Instituto Nacional de Salud, Lima los cuales contaron con el certificado sanitario correspondiente (ANEXO 2).

**3.1.2A CRITERIOS DE INCLUSIÓN:** Ratones machos Balb/c/CNPB de 20-25 gramos que se adaptaren a las condiciones climáticas y de experimentación.

**3.1.2B 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 y de experimentación.

## **3.2 MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO**

### **3.2.1 MATERIALES DE CAMPO**

Etiquetas autoadhesivas; cuchillo; tijeras de podar; prensa botánica; bolsas de polietileno; bolsas de papel; bolsas de herméticas de polietileno.

### **3.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO**

Tubos de ensayo; vasos de precipitado de 30, 50, 200 y 250 ml; placas petri; embudos; pipetas de 1, 2 y de 5ml; matraz de 100 ml; Probetas de 100 ml; baguetas; goteros; gradillas; soporte universal; papel filtro; algodón, cilindro octagonal de 45 cm de altura y 20 cm de diámetro.

### **3.2.3 INSTRUMENTOS DE LABORATORIO**

Balanza analítica sensible al 0.001 g; cronómetros; baño María; cocinilla eléctrica; estufa; congeladora; cámara digital; termómetros, espectrofotómetro UV-Vis,

### **3.2.3 SOLVENTES**

Etanol al 96%; agua destilada; agua ultra pura; solución fisiológica al 0.9%; éter de petróleo; cloroformo; metanol técnico,

### **3.2.3 OTROS MATERIALES**

Focos de 50 y 100 watts; cajas de polietileno para criar a los animales de experimentación; Guantes quirúrgicos descartables, cubetas de vidrio.

## **3.3 DISEÑO METODOLÓGICO**

### **3.3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN.**

El cribado de actividad antidepresiva de los extractos etanólicos obtenidos de las partes aéreas en floración de algunas especies de *Hypericum* (*H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium* e *H. silenoides*) del Perú mediante la prueba de natación forzada constituye una investigación experimental puesto que se consideró únicamente una variable dependiente y otra independiente.

### **3.3.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.**

El diseño de la investigación se encuentra en los **ANEXOS 3, 6 y 7**, de acuerdo a los ensayos y a los datos a recolectar.

### **3.3.3 VARIABLES: DEFINICIÓN CONCEPTUAL Y OPERACIONAL.**

#### **A. VARIABLES IMPLICADAS**

##### **VARIABLE INDEPENDIENTE**

Dosis de los extractos secos etanólicos de las partes aéreas en floración de algunas especies de *Hypericum* administrados en ratones Balb/c/CNPB por vía oral.

##### **VARIABLE DEPENDIENTE**

Actividad de tipo antidepresivo manifestado en ratones Balb/c/CNPB posterior a la administración de los extractos etanólicos de las partes aéreas en floración de algunas especies de *Hypericum*.

## B. VARIABLES NO IMPLICADAS

### VARIABLES INTERVINIENTES

#### De los animales de experimentación.

Especie, alimentación, ambiente de crianza y experimentación.

#### De la planta en estudio.

Partes a recolectar y utilizar, Secado del material vegetal

#### De los extractos a evaluar.

Tipo de extracción, Solvente a utilizar, Tiempo de extracción, Temperatura de extracción, Evaporación de los solventes.

#### De la administración de los extractos.

Vía de administración, Vehículo, Co-solvente.

### VARIABLES SUBJETIVAS

Las variables subjetivas fueron eliminadas debido a que el estudio fue de tipo doble ciego. Se recurrió a etiquetar los diferentes tratamientos con códigos los cuales fueron desconocidos para el investigador.

## OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

### VARIABLE INDEPENDIENTE: DOSIS DE EXTRACTO SECO

**Definición conceptual.-** Cantidad de extracto seco etanólico administrado por vía oral de acuerdo al peso a los animales de experimentación (**SÁNCHEZ-MATEO et al., 2002**).

#### Definición operacional.-

<i>Naturaleza:</i>	Cuantitativa
<i>Forma de medición:</i>	Directa
<i>Escala de medición:</i>	Razón
<i>Procedimiento de medición:</i>	Se mide pesando la cantidad de extracto seco de algunas especies de <i>Hypericum</i> de acuerdo al peso a los animales de experimentación a las dosis de 125, 250, 500 y 1000 mg/Kg de peso.
<i>Expresión final de la variable:</i>	mg/kg

## VARIABLE DEPENDIENTE: ACTIVIDAD DE TIPO ANTIDEPRESIVO

**Definición conceptual:** Es el restablecimiento a la normalidad de todo estado emocional anormal caracterizado por un excesivo sentimiento de tristeza, melancolía, desánimo, demérito, vacío y desesperanza, en grado inapropiado y desproporcionado respecto a la realidad.

**Definición operacional.-**

### INDICADOR:

#### Tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado

**Definición conceptual:** es el tiempo durante el cual el animal de experimentación deja de nadar y no realiza ningún esfuerzo por escapar de la cubeta y únicamente ejecuta movimientos necesarios para mantener su cabeza por encima del nivel del agua (PORSOLT *et al.*, 1977b).

#### Definición operacional:

<i>Naturaleza:</i>	Cuantitativa
<i>Forma de medición:</i>	Directa
<i>Escala de medición:</i>	Razón
<i>Procedimiento de medición:</i>	La actividad antidepresiva se mide determinado la reducción del tiempo de inmovilidad de los animales sometidos a la prueba de natación forzada una hora después de la administración de los extractos.
<i>Expresión final de la variable:</i>	Minutos

## CONTROL DE LAS VARIABLES INTERVINIENTES

### DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

- **Especie:** ratones (sexo macho) de la cepa Balb/c/CNPB, provenientes del Instituto Nacional de Salud, Lima.
- **Alimentación:** Todos los animales de experimentación fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de libre acceso a agua y

alimento, y se les brindo diariamente comida estándar para roedores proveído por el bioterio de procedencia.

- **Ambiente de crianza y experimentación:** Los animales fueron mantenidos en el laboratorio del C-305 del Centro de Estudios de Plantas Medicinales Y Alimenticias – CEPLAM, ubicado en el pabellón de Ciencias Biológicas, a una temperatura de  $20 \pm 2$  °C don un ciclo artificial de luz/oscuridad de 12/12 horas. Las jaulas fueron secadas y limpiadas diariamente.

#### DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO

- **Partes a recolectar y utilizar:** Se colectaron y utilizaron las partes aéreas en floración.
- **Secado del material vegetal:** Se realizó el secado de las partes aéreas en floración en un ambiente ventilado y protegido de la luz solar.

#### DE LOS EXTRACTOS

- **Tipo de extracción:** El material vegetal fue extraído por maceración.
- **Solvente utilizado:** Se utilizó etanol AL 96% como solvente.
- **Tiempo de extracción:** Se realizó una maceración por 10 días.
- **Temperatura de extracción:** Se realizó a temperatura ambiente.
- **Evaporación de los solventes:** Los extractos crudos etanólicos fueron evaporados a sequedad bajo condiciones de temperatura presión reducida.

#### DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS

- **Vía de administración:** Los extractos fueron administrados por vía oral.
- **Vehículo:** solución acuosa de Polisorbato (Twenn 80) al 2%.

### 3.3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

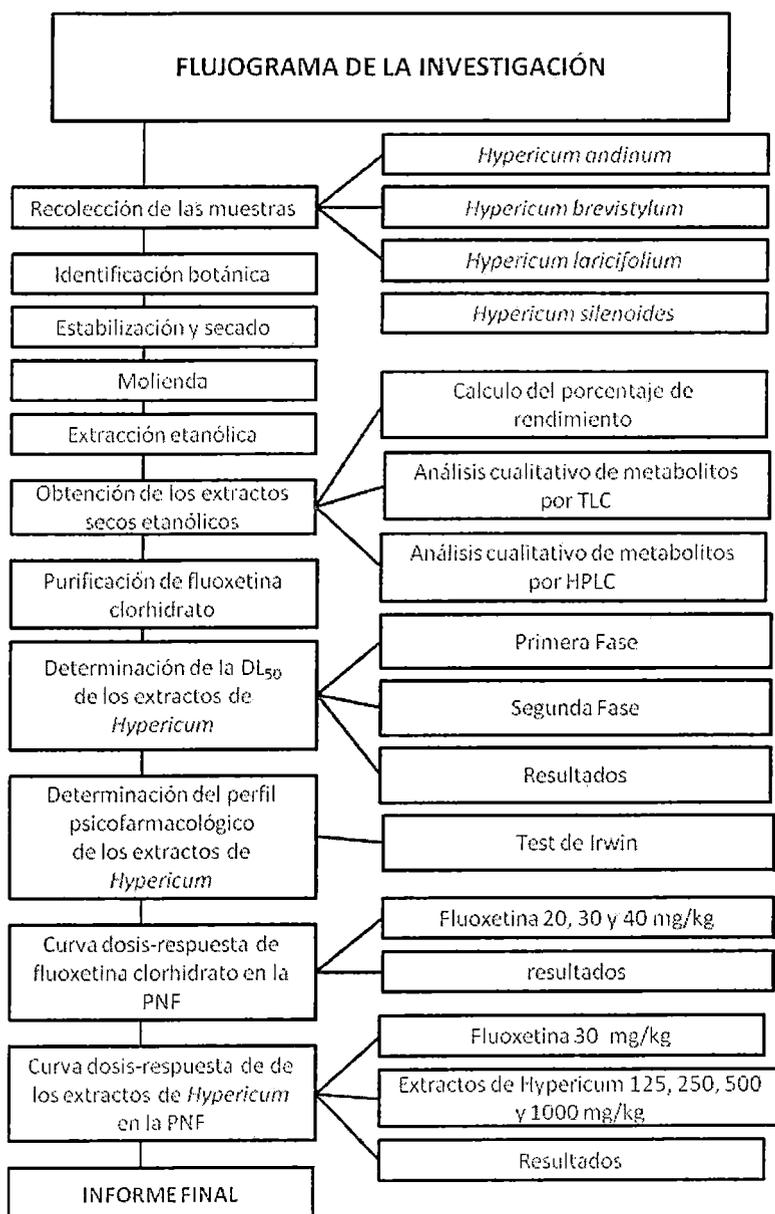
Se utilizaron fichas de recolección de datos previamente elaboradas de acuerdo a los ensayos y a los datos a recolectar (**ANEXOS 4 y 8**).

### 3.3.5 TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS.

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de la prueba *post-hoc* de Dunnett para realizar comparaciones múltiples con ayuda del software GraphPad 5.0. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar medio (E.S.M). Las diferencias con  $p < 0,05$  entre los grupos experimentales comparados con el grupo control fueron considerados estadísticamente significativos.

### 3.4 PROCEDIMIENTOS

FIGURA N°24. Flujoograma de la investigación.



FUENTE: Propia.

### 3.4.1 ANÁLISIS FITOQUÍMICO.

#### 3.4.1A PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS.

Para la determinación del porcentaje de rendimiento se tomaron 50 g de material vegetal seco y molido de cada especie en estudio. Los extractos se prepararon por maceraron (relación planta solvente 1:10) con etanol comercial (primera maceración por 10 días, seguida de dos maceraciones consecutivas de 24 horas cada una). Los extractos fueron filtrados y concentrados bajo presión reducida, con ayuda de rotavapor, a una temperatura menor de 45°C. Los extractos fluidos fueron transferidos en viales de vidrio de 50 ml y depositados posteriormente en una estufa a 40°C para completar la evaporación de agua residual. Se determinó el porcentaje de rendimiento de los extractos secos por diferencia de pesos con ayuda de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{[(\text{peso de vial} + \text{extracto seco}) - \text{peso de vial}] \times 100}{50 \text{ g}}$$

Los extractos obtenidos fueron almacenados y conservados para su utilización en ensayos farmacológicos y toxicológicos posteriores.

#### 3.4.1B ANÁLISIS CUALITATIVO DE METABOLITOS POR TLC.

Para la identificación cualitativa de hipericinas, flavonoides y ácidos fenólicos, se procedió de acuerdo al método de **WAGNER y BLADT, 1996**. Se tomaron 2 g de material vegetal seco de cada especie en estudio en viales de vidrio de 15 ml y se realizó una maceración con 10 ml de etanol por 24 horas, los extractos fueron filtrados y transferidos a viales nuevos para su utilización en las pruebas de TLC.

**Muestras** Partes aéreas en floración del *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. struthiolifolium*, *H. silenoides* e *H. perforatum* (muestra comercial del hospital Antonio Lorena); se requiere 25 µl de extractos etanólicos.

**Fase Móvil** Acetato de etilo - ácido fórmico - ácido acético glacial – agua, en una relación de 100 : 11 : 11 : 26.

**Fase**

**Estacionaria** Placas de polietileno (6X5 cm) recubiertas con silicagel 60F.

**Revelador** Reactivo de productos naturales “NPR” (solución al 1% de difenilborinato de 2-aminoetilo en metanol).

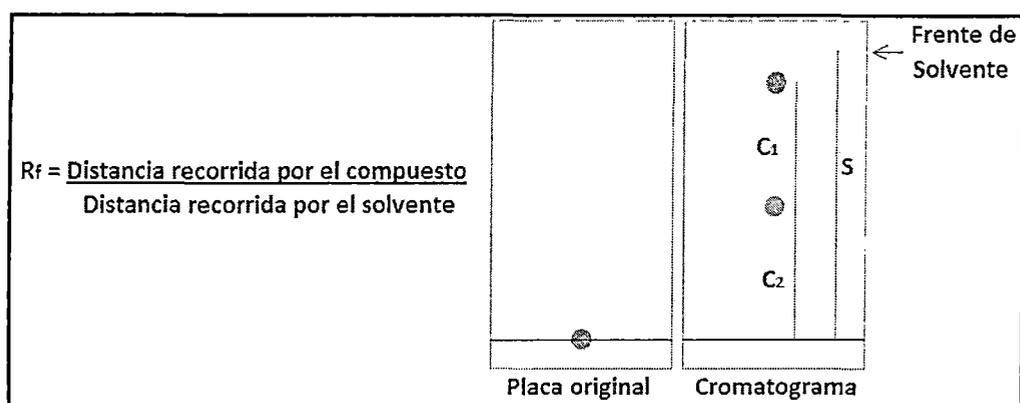
**R<sub>f</sub> de**

**Referencia** Rutina (R<sub>f</sub> 0.35), ácido clorogénico (R<sub>f</sub> 0.4), hiperósido (R<sub>f</sub> 0.5), isoquercitrina (R<sub>f</sub> 0.6) e quercitrina (R<sub>f</sub> 0.7).

**Detección** En la región de luz visible: después de la aplicación del NPR se puede apreciar las hipericinas como regiones verde-marrón, y los glicósidos de flavonoles como regiones amarillo-naranja. En la región de luz ultravioleta: después de la aplicación del NPR se puede observar zonas prominentes rojo-violeta correspondiente a las hipericinas (R<sub>f</sub> 0.75-0.8), y alrededor de cinco zonas de flavonol glicósidos fluorescentes amarillo brillantes (R<sub>f</sub> 0.35-0.7) y zonas de ácidos carboxílicos fenólicos azul fluorescentes como el ácido clorogénico (R<sub>f</sub> 0.4). Las agliconas, como la quercetina, migran con las clorofilas al frente de solvente.

Se procedió a la aplicación de 25 µl de cada uno de los extractos en una placa de 6 x 5 cm de silicagel 60F. Al terminar las aplicaciones se preparó la fase móvil la cual fue vertida en la cámara cromatografía para la estabilización del medio. Se procedió a la corrida cromatografía colocando la placa dentro de la cámara cromatografía por un periodo suficiente para que el solvente alcance el frente. Se retiró la placa y posteriormente se secó para realizar las comparaciones respectivas. Las corridas se realizaron por triplicado. La determinación de los valores de R<sub>f</sub> de las distintas zonas se determinó con ayuda de la siguiente fórmula:

FIGURA N°25. Definición gráfica del factor de retención ( $R_f$ ).



FUENTE: Adaptación.

### 3.4.1C ANÁLISIS CUALITATIVO DE METABOLITOS POR HPLC.

Para la identificación cualitativa de hipericinas, flavonoides, ácidos fenólicos y floroglucinoles, se procedió de acuerdo al método de GANZERA *et al.*, 2002. EL análisis por HPLC fue desarrollado con un equipo HPLC Thermo-Finnigan acoplado a un detector de arreglo de diodos Thermo-Quest. Se pesaron 10 mg de cada uno de los extractos secos, los cuales fueron re-disolvieron en metanol grado HPLC. Se filtró y se procedió a la inyección de 10 $\mu$ l de los extractos re-disueltos en el equipo de HPLC. El monitoreo se realizó en el rango de 200 a 650 nm. Para la edición de los cromatogramas se seleccionó la longitud de onda de 280 nm. La corrida cromatográfica se desarrolló bajo las siguientes condiciones:

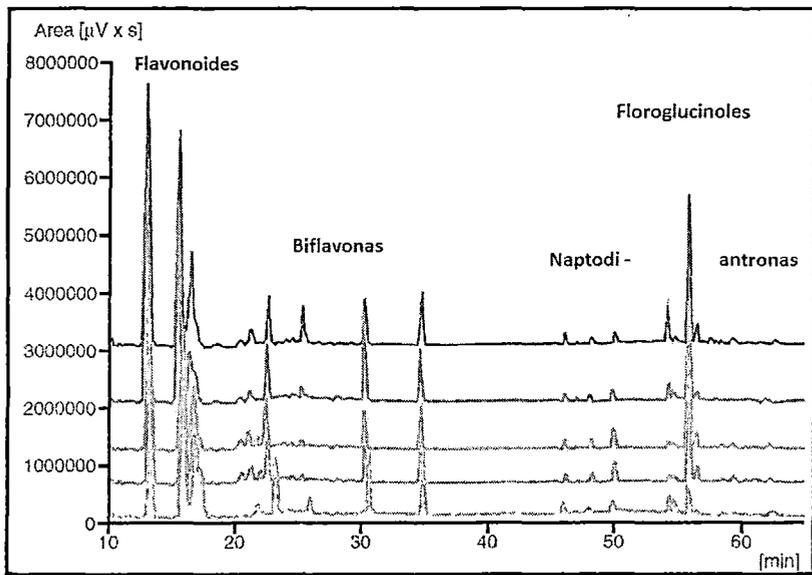
- Fase estacionaria** Columna Synergi-MAX RP (C12; Phenomenex), acoplado a una pre-columna C8.
- Fase móvil** A: Buffer acetato de amonio 10 mM ajustado a pH 5.0 con ácido acético glaciar.  
B: Mezcla de acetonitrilo metano en relación 9 : 1.
- Muestras** 10 $\mu$ l de extractos re-disueltos en metanol grado HPLC.
- Gradiente** De 87A/13B en 10 minutos a 83A/17B, luego en 25 minutos a 100B.

**Flujo** 0.3 ml/min

**Temperatura** 40°C

**Conducta Cromatográfica** Se distingue distintas regiones en función a la polaridad de los distintos componentes de los extractos de *Hypericum*. Los flavonoides son los primeros compuestos en ser eluidos, seguido por las biflavonas. Las moléculas apolares, naftodiantronas y floroglucinoles, son eluidas finalmente.

**FIGURA N°24.** Conducta cromatográfica por HPLC de los metabolitos del *Hypericum perforatum*.

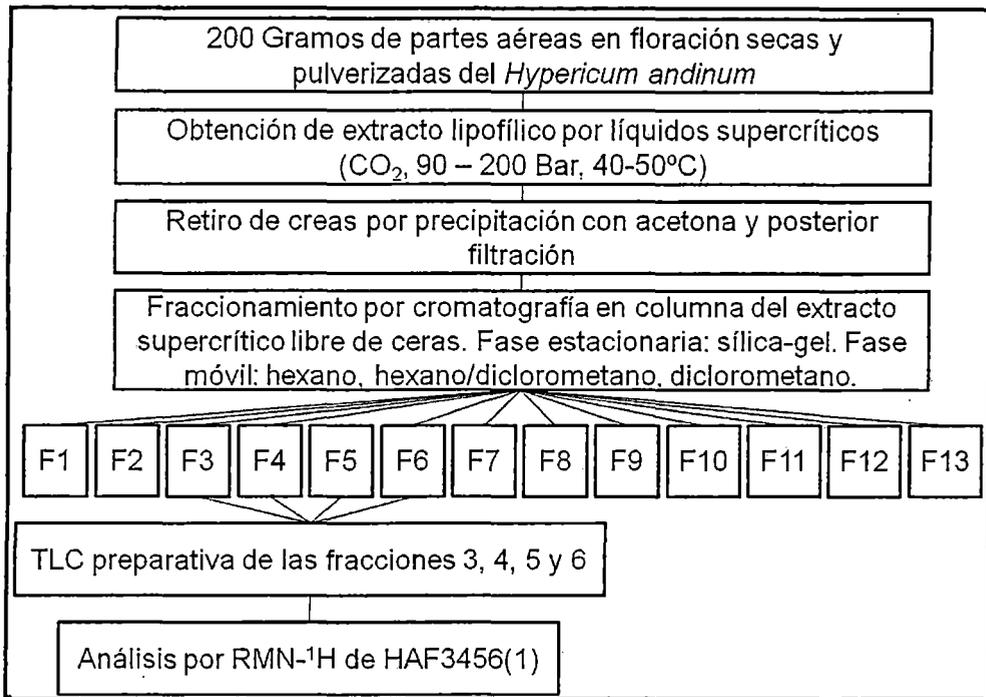


FUENTE: GAEDCKE, 2003.

### 3.4.1D AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE FLOROGLUCINOLES.

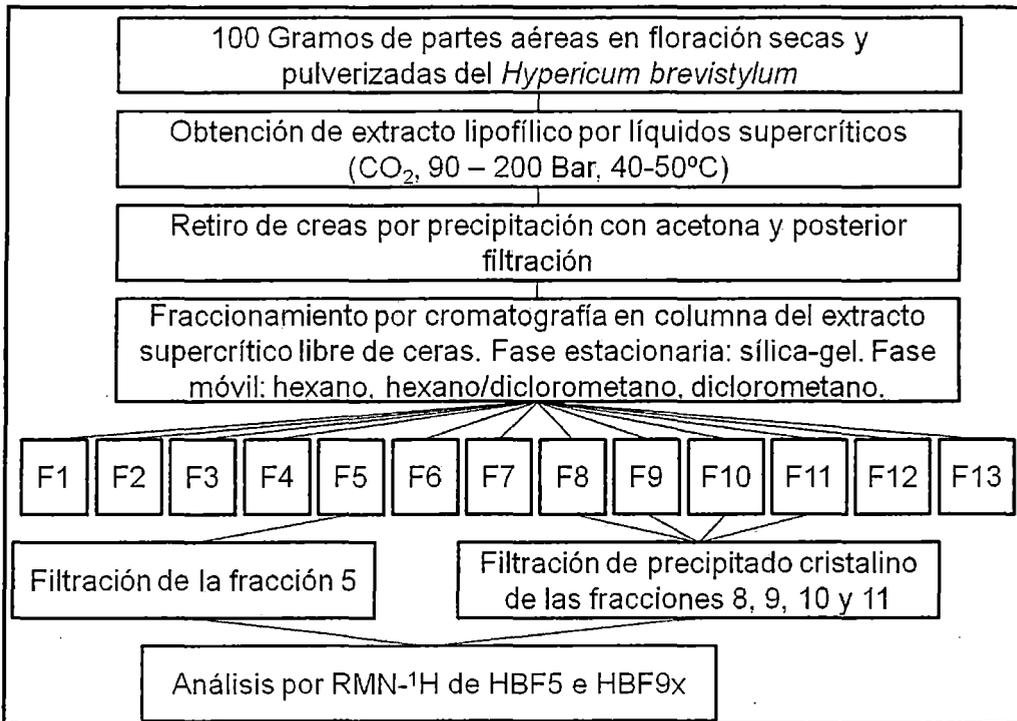
Para el aislamiento e identificación de los floroglucinoles mayoritarios presentes en las partes aéreas en floración del *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium* e *H. laricifolium*, se procedió a la obtención de extractos altamente lipofílicos mediante la extracción por líquidos supercríticos (Gas utilizado, CO<sub>2</sub>; temperatura de extracción: 40-50°C; presiones de extracción: 90-200 Bar). Se retiraron las ceras de los extractos obtenidos por precipitación con acetona. Los extractos libres de ceras fueron fraccionados por cromatografía en columna y en ocasiones se sometieron a TLC preparativa según los siguientes procedimientos basados en ROCHA *et al.*, 1995 y ROCHA *et al.*, 1996.

**TABLA N°9.** Procedimientos para el aislamiento e identificación del floroglucinol mayoritario a partir de un extracto supercrítico de las partes aéreas en floración del *Hypericum andinum*.



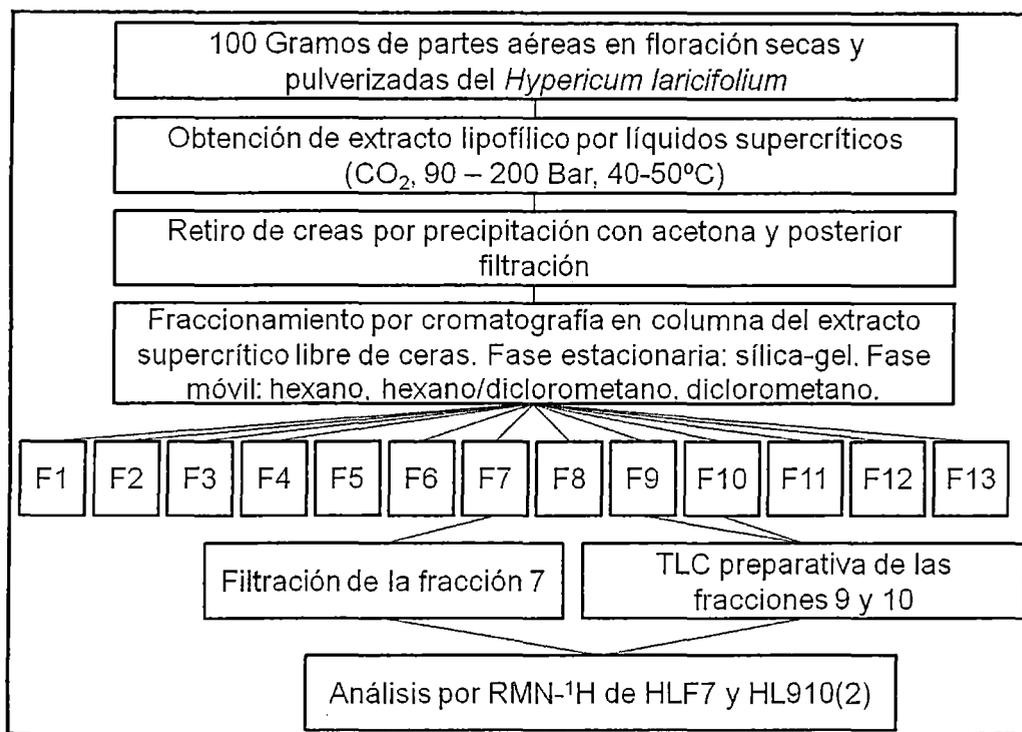
FUETE: Propia

**TABLA N°10.** Procedimientos para el aislamiento e identificación de floroglucinos mayoritarios a partir de un extracto supercrítico de las partes aéreas en floración del *Hypericum brevistylum*.



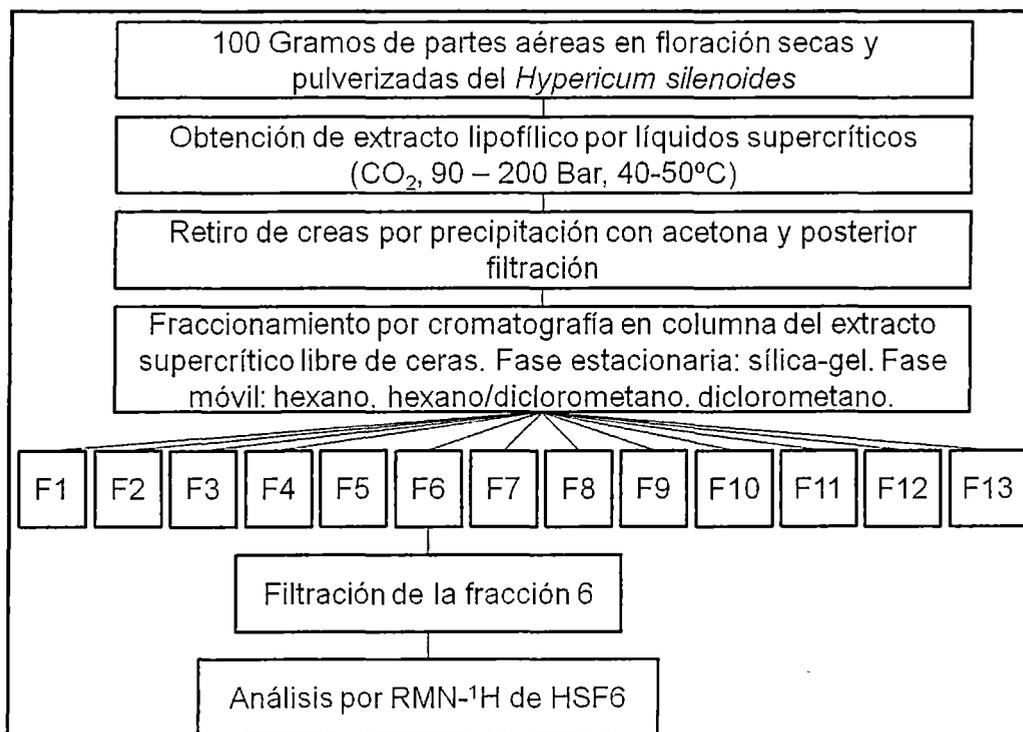
FUENTE: Propia.

**TABLA N°11.** Procedimientos para el aislamiento e identificación de floroglucinoses mayoritarios a partir de un extracto supercrítico de las partes aéreas en floración del *Hypericum laricifolium*.



FUENTE: Propia.

**TABLA N°12.** Procedimientos para el aislamiento e identificación del floroglucinol mayoritario a partir de un extracto supercrítico de las partes aéreas en floración del *Hypericum silenoides*.



FUENTE: Propia.

### **3.4.2. ANÁLISIS TOXICOLÓGICO.**

#### **3.4.2A DETERMINACIÓN DE LA DL<sub>50</sub>.**

Se procedió de acuerdo al método de **LORKE, 1983**. Inicialmente se determinó el rango aproximado de toxicidad aguda. Se administraron dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg de los extracto seco etanólicos de las plantas en estudio, disueltos en una solución acuosa de Polisorbato (Tween 80) al 2%. Para esta primera fase se utilizaron tres animales por cada nivel de dosis. Los resultados de esta primera etapa fueron utilizados para determinar las dosis subsecuentes según el método de **LORKE, 1983**. En cada fase, los animales fueron observados por un periodo de 24 horas. Los grupos experimentales, incluidos en el presente estudio, y en diseño metodológico están detallados en el **ANEXO 3**.

#### **3.4.2B DETERMINACIÓN DEL PERFIL PSICOFARMACOLÓGICO.**

Los principales signos de neurotoxicidad, depresión del SNC y efectos sobre la función autonómica, fueron evaluados con ayuda de los criterios propuestos por **IRWIN, 1968** y **ROUX et al., 2003**. La descripción de los criterios evaluados y la hoja de recolección de datos utilizada se encuentran en los **ANEXOS 4 y 5**.

### **3.4.3 ANÁLISIS FARMACOLÓGICO.**

#### **3.4.3A EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FLUOXETINA.**

Se preparó clorhidrato de fluoxetina (a partir de capsulas genéricas de fluoxetina 20 mg, suministrado por el Hospital Regional, Cusco) siguiendo el método de **McCONATHY et al., 2007** mediante la transferencia del contenido de las cápsulas en un medio de acuoso básico (pH 10 con NaOH 0,1 N) y tres extracciones consecutivas con acetato de etilo. Los extractos orgánicos que contenían la droga fueron combinados y secados con sulfato de magnesio anhidro el que se eliminó posteriormente por filtración con papel Whatman N°2. Más tarde, el disolvente orgánico fue eliminado por rotaevaporación bajo presión reducida para proporcionar la base libre fluoxetina. La base libre se convirtió fácilmente en su sal de clorhidrato mediante la disolución en una

mínima cantidad de etanol necesario para obtener una solución homogénea y la adición posterior gota a gota de una solución de ácido clorhídrico en éter dietílico.

### **3.4.3B PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA EN RATONES.**

Los ratones albinos machos Balb/c/CNPB (20-24g) provenientes del INS, fueron alojados en grupos de 20 animales por jaula (30 x 25 x 15 cm) en el laboratorio del CEPLAM dos semanas antes de los estudios farmacológicos. Los animales se mantuvieron en un entorno de temperatura controlada ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) con ayuda de calefactores. Se ofreció alimento y agua a libre disposición. Los sujetos fueron experimentalmente nuevos y se utilizaron sólo una vez. Todos los animales se mantuvieron en ayuno durante la noche antes de los experimentos.

Los extractos de plantas y fármacos utilizados fueron suspendidas en una solución acuosa de Polisorbato (Twenn 80) al 2% y fueron administrados por vía oral antes de los experimentos en un volumen de dosis de 0,5 ml/20 g de peso corporal. Los controles recibieron sólo el vehículo y fueron sometidos a las mismas condiciones que los grupos experimentales.

El método utilizado fue el descrito por **PORSOLT *et al.* (1977b)**. Los ratones fueron colocados individualmente en un cilindro (altura = 25 cm, diámetro = 13 cm) con 10 cm de agua ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) del cual no podía escapar durante 6 minutos. Todas las sesiones de prueba fueron grabadas por una cámara de video colocada justo encima de los cilindros. Todas las pruebas se llevaron a cabo en un día y tuvo lugar entre las 08:00 y 15:00 h. Las grabaciones de vídeo se analizaron más tarde bajo condiciones de doble ciego. La medición conductual observada en las grabaciones de video fue la duración de la inmovilidad en los últimos 4 minutos del período de prueba. Un ratón fue juzgado como inmóvil cuando cesaron todos los comportamientos activos (es decir, lucha, natación y saltos) y se mantuvo pasivo flotante o realizaba movimientos mínimos necesarios para mantener la nariz fuera del agua. Los grupos experimentales, incluidos en el presente estudio, el diseño metodológico, y la hoja de recolección de datos están detallados en los **ANEXOS 6, 7 y 8**.

### **3.4.3C CURVA DOSIS RESPUESTA DE FLUOXETINA CLORHIDRATO.**

Para determinar la curva dosis-respuesta del efecto de la fluoxetina en la prueba de natación forzada se eligieron las dosis de 20, 30 y 40 mg/kg de peso. Las dosis fueron elegidas considerando datos publicados por LUCKI *et al.*, 2001 y CASTAGNÉ *et al.*, 2009.

### **3.4.3D CURVA DOSIS RESPUESTA DE LOS EXTRACTOS SECOS ETANÓLICOS DE LAS ESPECIES DE *Hypericum*.**

Para determinar la curva dosis-respuesta de los extractos etanólicos de las partes aéreas en floración de las diferentes especies de *Hypericum* en estudio se eligieron las dosis de 125, 250, 500 y 1000 mg/kg. Las dosis fueron elegidas tomando en consideración datos publicados por DAUT *et al.*, 2000 y BUTTERWECK *et al.*, 2001.

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

TABLA N°13.

RESULTADOS DE PORCENTAJES DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS SECOS OBTENIDOS POR MACERACIÓN POR DIEZ DÍAS CON ETANOL AL 96%.

ESPECIE	RENDIMIENTO (%)
<i>Hypericum andinum</i>	35.64
<i>Hypericum brevistylum</i>	28.30
<i>Hypericum laricifolium</i>	24.60
<i>Hypericum silenoides</i>	23.14

FUENTE: Propia.

**Análisis y discusión:**

En la TABLA N°13 se aprecian los porcentajes de rendimiento de los extractos secos etanólicos obtenido de las partes aéreas en floración del *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium* e *H. silenoides*, por maceración de diez días con etanol al 96% con una relación planta solvente de 1:10. Se observa que el *H. andinum* presentó el mayor rendimiento con un 35.64% y el *H. silenoides* presentó el menor rendimiento entre las cuatro especies estudiadas con un 23.14%. El *H. brevistylum* e *H. laricifolium* presentaron rendimientos intermedios del 28.39 y 24.60%, respectivamente.

Nuestros resultados de porcentajes de rendimiento se asemejan a aquellos reportados por SÁNCHEZ-MATEO *et al.*, 2002 para el *H. canariense* (29.10%), *H. glandulosum* (31.98%), *H. grandifolium* (24.06%) e *H. reflexum* (27.80%), los cuales fueron obtenidos por maceración con metanol (2 veces x 78 horas) no habiéndose reportado la relación planta solvente utilizada.

Por otro lado se ha reportado por GNERRE *et al.*, 2001 que la maceración con metanol (3 veces x 24 horas en una relación planta solvente de 1:10) de las partes aéreas en floración del *H. caprifoliatum* (15%), *H. myrianthum* (11%), *H. piriiai* (15%), *H. cordatum* (9%), *H. carinatum* (11%), *H. connatum* (15%), *H. polyanthemum* (10%) e *H. brasiliense* (12%) produjo rendimientos menores a nuestro resultados.

Recientemente se ha reportado por WANG *et al.*, 2010 que la maceración por 24 horas de las partes aéreas en floración *H. enshiense* (8.4%) con etanol al 90% presenta un bajo rendimiento en comparación con nuestro resultados. Así se observa que tiempos prolongados de maceración mejoran el porcentaje de rendimiento de los extractos obtenidos de las especies de *Hypericum*.

TABLA N°14.

RESULTADOS DEL ANÁLISIS CUALITATIVO POR TLC DE LOS METABOLITOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DEL *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium*, *Hypericum silenoides* e *Hypericum struthiolifolium*.

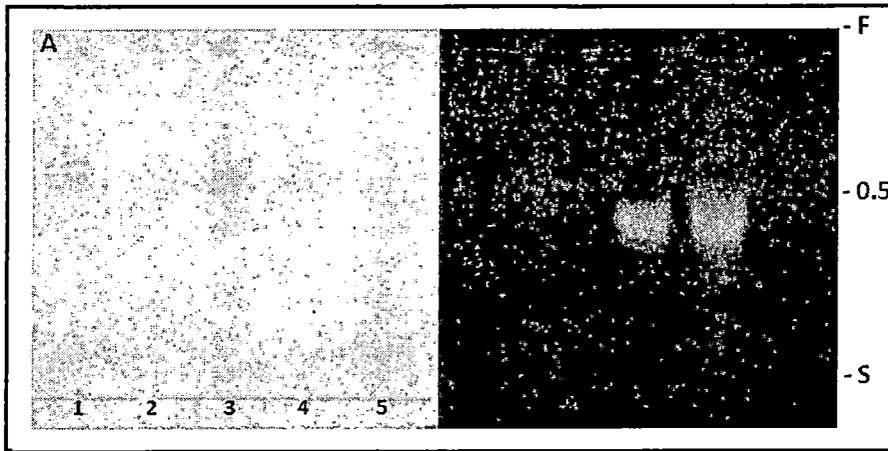
ESPECIE	Rutina	Ácido clorogénico	Hiperósido	Isoquercitrina	Quercitrina	Hipericina
(1) <i>H. brevistylum</i>	-	-	+ (Rf 0.5)	-	¿?	-
(2) <i>H. silenoides</i>	-	-	+ (Rf 0.5)	-	¿?	-
(3) <i>H. andinum</i>	-	+ (Rf 0.4)	+ (Rf 0.5)	-	¿?	-
(4) <i>H. struthiolifolium</i>	-	+ (Rf 0.4)	+ (Rf 0.5)	¿?	¿?	-
(5) <i>H. perforatum</i>	+ (Rf 0.35)	-	+ (Rf 0.5)	-	-	-
(6) <i>H. laricifolium</i>	-	.	+ (Rf 0.5)	¿?	¿?	-

FUENTE: Propia.

LEYENDA: + Presencia; - Ausencia; ¿? Presencia probable

FIGURA N°27.

CROMATOGRAMA DEL ANÁLISIS CUALITATIVO POR TLC DE LOS METABOLITOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DEL *Hypericum brevistylum*, *Hypericum silenoides*, *Hypericum andinum*, *Hypericum struthiolifolium*.



FUENTE: Propia.

LEYENDA: A: Luz visible, B: Luz UV, 1: *H. brevistylum*, 2 *H. silenoides*, 3: *H. andinum*, 4: *H. struthiolifolium*, y 5: *H. perforatum*.

### Análisis y discusión:

En la TABLA N°14 y FIGURA N°27 se aprecian los resultados del análisis cualitativo por TLC de los metabolitos presentes en los extractos etanólicos del *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium*, *H. silenoides* e *H. struthiolifolium*, en comparación con una muestra de *H. perforatum*. Se evidencia la presencia de flavonoides derivados de la quercetina, siendo el hiperósido el metabolito común entre las seis especies estudiadas. La presencia de rutina fue

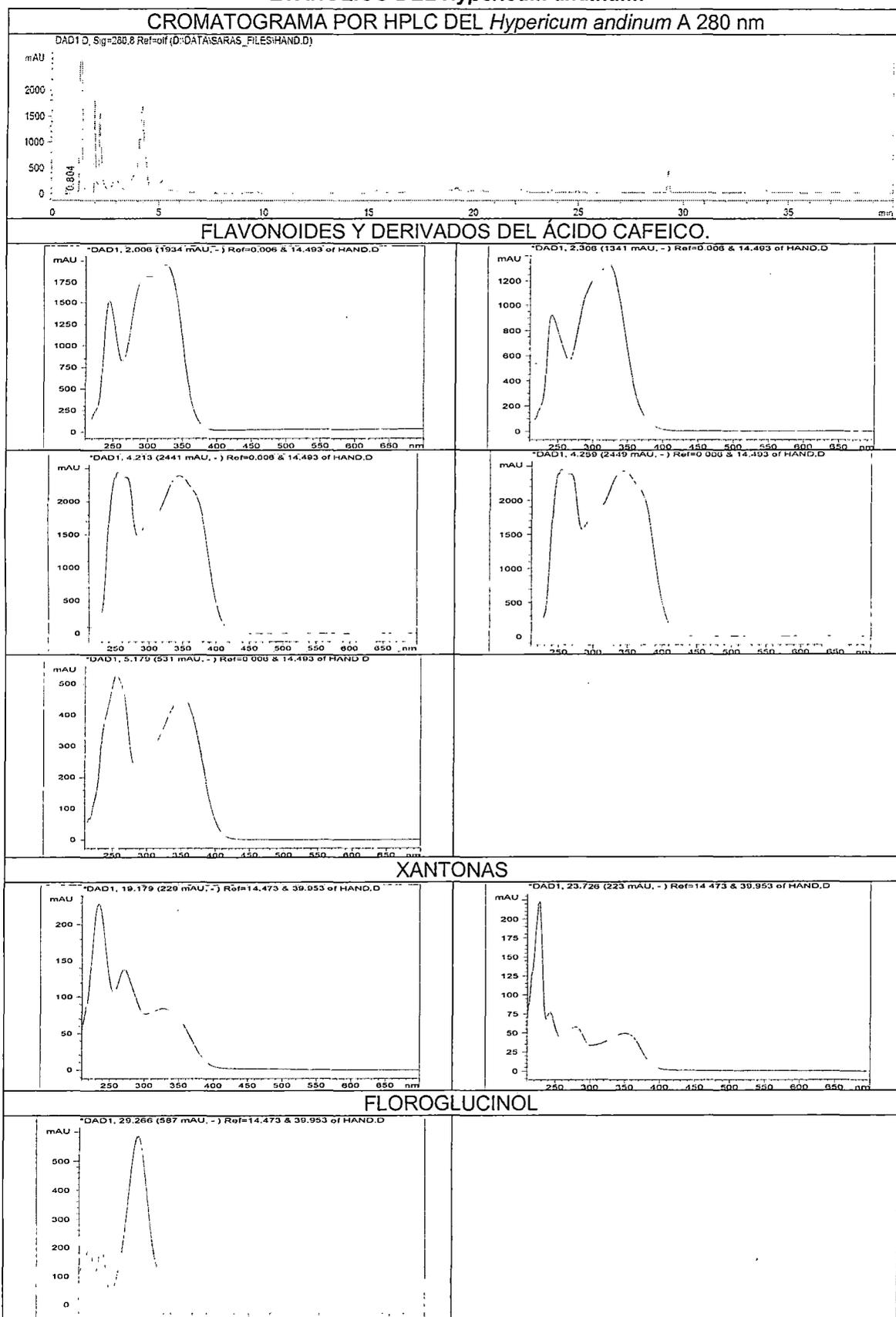
únicamente evidente en el *H. perforatum*, mientras que el ácido clorogénico se detectó en el *H. andinum*, e *H. struthiolifolium*. Se evidenció también la presencia probable de quercitrina e isoquercitrina. No se evidenció la presencia de naftodiantronas en las especies estudiadas.

Se ha reportado por HILLIWIG *et al.*, 2008 y NUNES *et al.*, 2010 que las especies del género *hypericum* tienen una fuerte tendencia a acumular compuestos fenólicos. Estos metabolitos incluyen flavonoides, xantonas, antronas, diantronas y/o acilfloroglucinoles. Adicionalmente ZOBAYED *et al.*, 2006 reportó que las hipericinas son sintetizadas en vesículas especiales denominadas glándulas negras. Existe una buena correlación entre la presencia de estas glándulas y dichos pigmentos en los extractos de *Hypericum*, sin embargo se ha determinado por MATHIS y OURISSON, 1967 y FERRAZ *et al.*, 2002a y que no todas las especies del género contienen este tipo de pigmentos, el cual únicamente aparece en las especies de *Hypericum* de secciones evolucionadas. Las especies de *Hypericum* de las secciones *Brathys* y *Trigynobrathys* carecen de glándulas negras, y hasta la fecha no se ha detectado hipericinas en los miembros de estas secciones. La ausencia de hipericinas en el cromatograma en TLC de las especies de *Hypericum* analizadas en el presente estudio concuerda con dichas investigaciones.

Se ha reportado por AVATO, 2005 que los ácidos fenólicos también son compuestos característicos de los extractos de *Hypericum*. El ácido clorogénico ha sido determinado en varias especies de la sección *Trigynobrathys* por NUNES *et al.*, 2010 en donde ha sido planteado como posible marcador quimiotaxonómico. Nuestros resultados demuestran la posible presencia de ácido clorogénico en 2 especies de *Hypericum* de la sección *Brathys*.

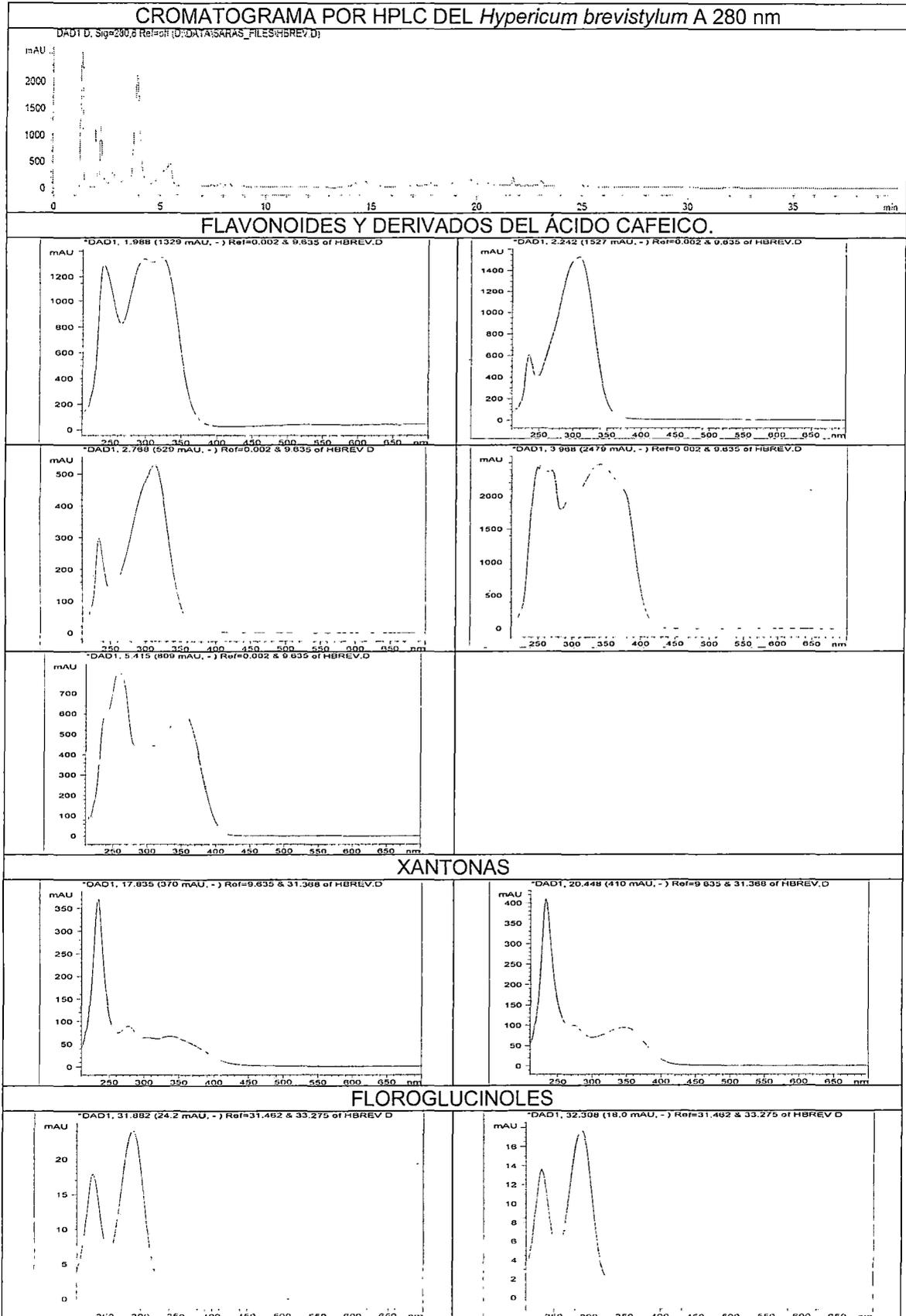
Se ha reportado por HILLWIG *et al.*, 2008 que los flavonoides observados en el género *Hypericum*, como son el hiperósido, rutina, isoquercitrina, quercitrina y quercetina, son sintetizados por la enzima chalcona sintasa. El flavonoide rutina parece ser un metabolito común dentro del género *Hypericum*. Sin embargo, bajo condiciones normales, se ha reportado por NUNES *et al.*, 2010 que este metabolito, hasta el momento, no ha sido encontrado en especies de las secciones *Brathys* y *Trigynobrathys*. La ausencia de rutina y la presencia de hiperósido en las especies analizadas concuerdan con investigaciones previas.

**TABLA N°15.**  
**CROMATOGRAMA Y ESPECTROS UV-VIS SELECCIONADOS OBTENIDOS POR HPLC-**  
**DAD DE LOS METABOLITOS PRINCIPALES PRESENTES EN EL EXTRACTO SECO**  
**ETANÓLICO DEL *Hypericum andinum*.**



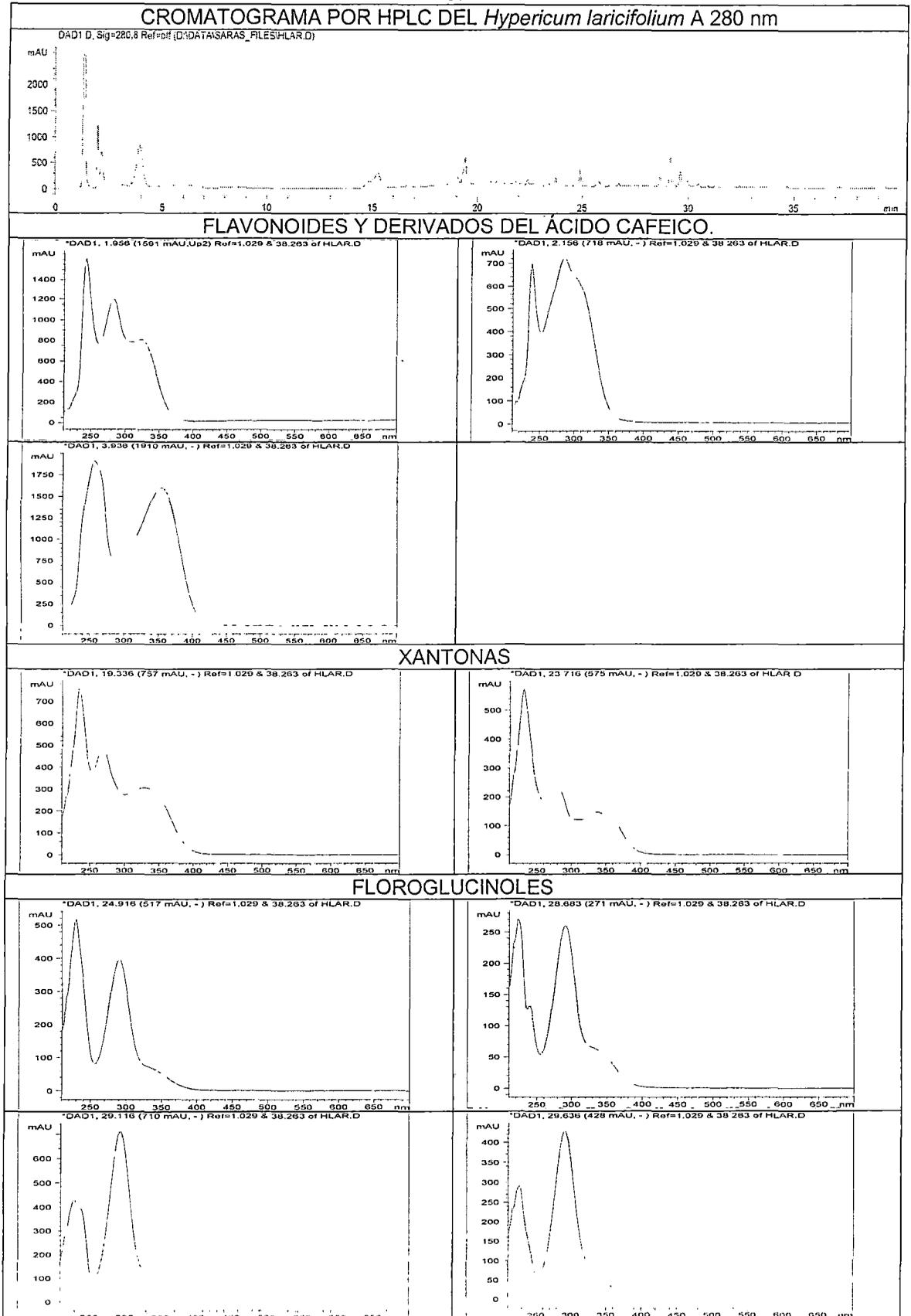
FUENTE: Propia.

**TABLA N°16.**  
**CROMATOGRAMA Y ESPECTROS UV-VIS SELECCIONADOS OBTENIDOS POR HPLC-**  
**DAD DE LOS METABOLITOS PRINCIPALES PRESENTES EN EL EXTRACTO SECO**  
**ETANÓLICO *Hypericum brevistylum*.**



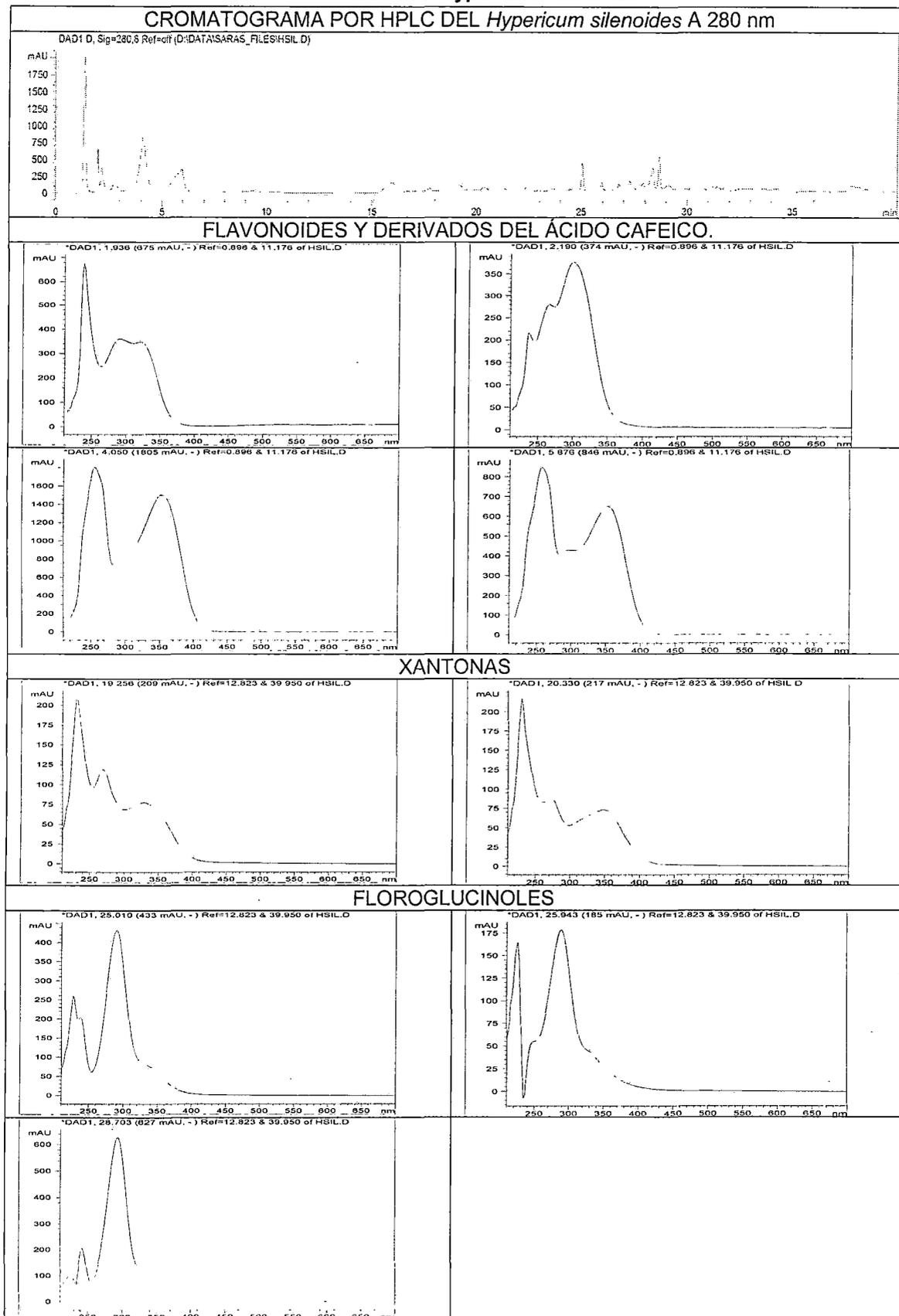
FUENTE: Propia.

**TABLA N°17.**  
**CROMATOGRAMA Y ESPECTROS UV-VIS SELECCIONADOS OBTENIDOS POR HPLC-**  
**DAD DE LOS METABOLITOS PRINCIPALES PRESENTES EN EL EXTRACTO SECO**  
**ETANÓLICO DEL *Hypericum laricifolium*.**



FUENTE: Propia.

**TABLA N°18.**  
**CROMATOGRAMA Y ESPECTROS UV-VIS SELECCIONADOS OBTENIDOS POR HPLC-**  
**DAD DE LOS METABOLITOS PRINCIPALES PRESENTES EN EL EXTRACTO SECO**  
**ETANÓLICO DEL *Hypericum silenoides*.**



FUENTE: Propia.

### **Análisis y discusión:**

En la TABLA N°15 se aprecia el cromatograma y los espectros UV-VIS obtenidos por HPLC-DAD de los metabolitos principales presentes en el extracto seco etanólico del *Hypericum andinum*. Se logra apreciar la presencia de flavonoides y derivados del ácido cafeico hasta los 6 minutos de tiempo de elución. Se aprecia la presencia de xantonas a los 19.17 y 23.72 minutos y un derivado del floroglucinol a los 29.26 minutos de tiempo de elución. No se detectó la presencia de naftodiantronas en el cromatograma del *Hypericum andinum*.

En la TABLA N°16 se aprecia el cromatograma y los espectros UV-VIS obtenidos por HPLC-DAD de los metabolitos principales presentes en el extracto seco etanólico del *Hypericum brevistylum*. Se logra apreciar la presencia de flavonoides y derivados del ácido cafeico hasta los 6 minutos de tiempo de elución. Se aprecia la presencia de xantonas a los 17.83 y 20.44 minutos y derivados del floroglucinol a los 31.88 y 32.30 minutos de tiempo de elución. No se detectó la presencia de naftodiantronas en el cromatograma del *Hypericum brevistylum*.

En la TABLA N°17 se aprecia el cromatograma y los espectros UV-VIS obtenidos por HPLC-DAD de los metabolitos principales presentes en el extracto seco etanólico del *Hypericum laricifolium*. Se logra apreciar la presencia de flavonoides y derivados del ácido cafeico hasta los 5 minutos de tiempo de elución. Se aprecia la presencia de xantonas a los 19.33 y 23.71 minutos y derivados del floroglucinol a los 24.91, 28.68, 29.11 y 29.63 minutos de tiempo de elución. No se detectó la presencia de naftodiantronas en el cromatograma del *Hypericum laricifolium*.

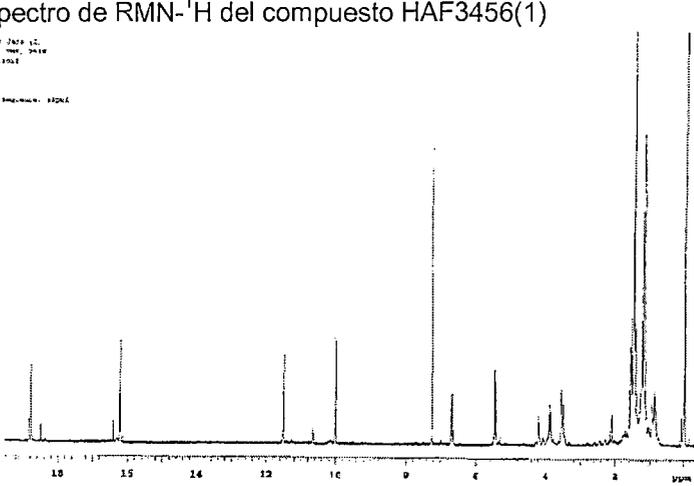
En la TABLA N°18 se aprecia el cromatograma y los espectros UV-VIS obtenidos por HPLC-DAD de los metabolitos principales presentes en el extracto seco etanólico del *Hypericum silenoides*. Se logra apreciar la presencia de flavonoides y derivados del ácido cafeico hasta los 6 minutos de tiempo de elución. Se aprecia la presencia de xantonas a los 19.25 y 20.33 minutos y derivados del floroglucinol a los 25.01, 25.94 y 28.70 minutos de tiempo de elución. No se detectó la presencia de naftodiantronas en el cromatograma del *Hypericum silenoides*.

Se ha reportado por PAL SINGH y BHARATE, 2006 la presencia de muchos floroglucinoses descritos en los miembros de las secciones *Brathys* y *Trigynobrathys* del género *Hypericum*, en especial los derivados diméricos como la uliginosina B, japónica, hiperbrasilol, etc. DEMIRKIRAN, 2007 ha reportado que las xantonas son metabolitos presentes en pocas familias y tienen un alto valor como marcadores quimiotaxonómico. La 1,5-dihidroxixantona, 5-hidroxi-1-metoxixantona y 6-deoxyjacareubina son algunas de las xantonas presentes en las especies de las secciones *Brathys* y *Trigynobrathys* del género *Hypericum*. Recientemente se ha determinado la presencia de flavonoides, principalmente hiperósido, derivados del ácido cafeico, en especial ácido clorogénico, y la ausencia de naftodiantronas en especie de *Hypericum* de la sección *Trigynobrathys* del sur del Brasil por NUNES *et al.*, 2010. Nuestros resultados concuerdan con las investigaciones antes mencionadas.

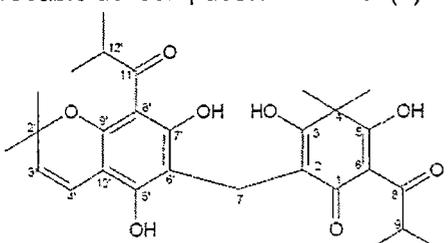
**TABLA N°19.**  
**DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE RMN-<sup>1</sup>H DEL COMPUESTO HAF3456(1) AISLADO DEL**  
***Hypericum andinum*.**

H	HAF3456(1) δ <sub>H</sub> (ppm)
4-Me	1,49
7	3,50
9	4,20
9-Me	1,20
2'-Me	1,49
3'	5,45
4'	6,70
12'	3,91
12'-Me	1,20
3-OH	10,00
5-OH	18,80
5'-OH	11,49
7'-OH	16,22

Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto HAF3456(1)

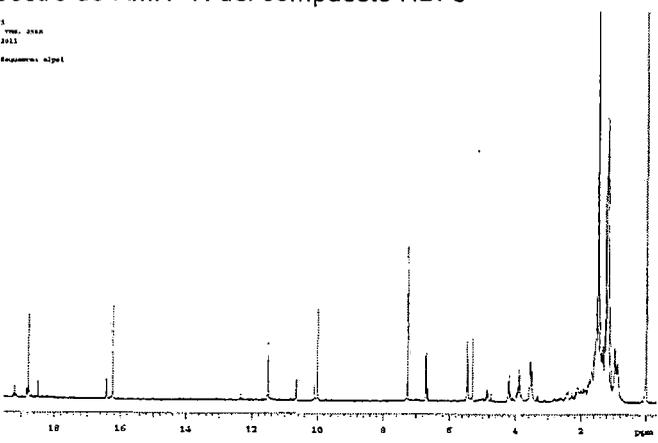
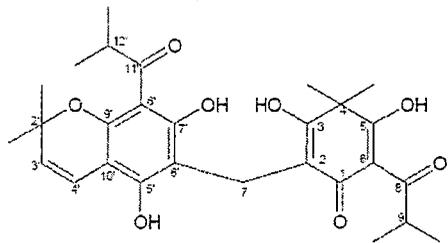


Estructura probable del compuesto HAF3456(1)



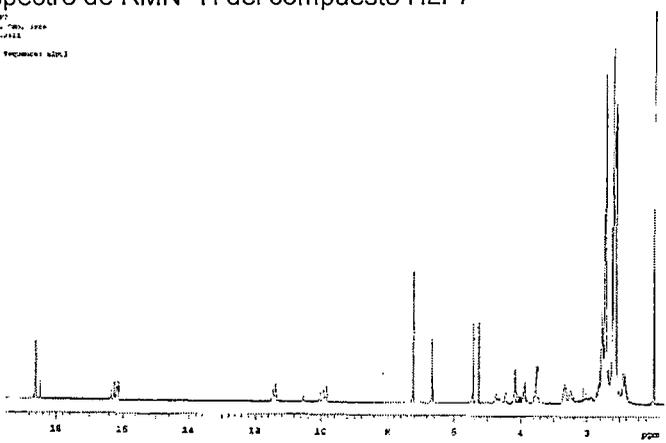
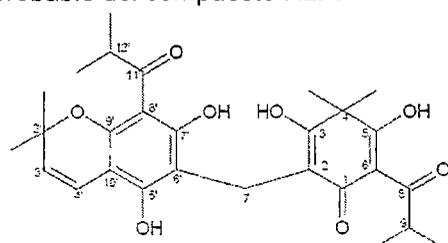
FUENTE: Propia.

**TABLA N°20.**  
**DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE RMN-<sup>1</sup>H DEL COMPUESTO HBF5 AISLADO DEL**  
*Hypericum brevistylum.*

H	HBF5 $\delta_H$ (ppm)	
4-Me	1,49	<p><b>Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto HBF5</b></p>  <p><b>Estructura probable del compuesto HBF5</b></p> 
7	3,50	
9	4,20	
9-Me	1,20	
2'-Me	1,49	
3'	5,45	
4'	6,70	
12'	3,91	
12'-Me	1,20	
3-OH	10,00	
5-OH	18,80	
5'-OH	11,49	
7'-OH	16,22	

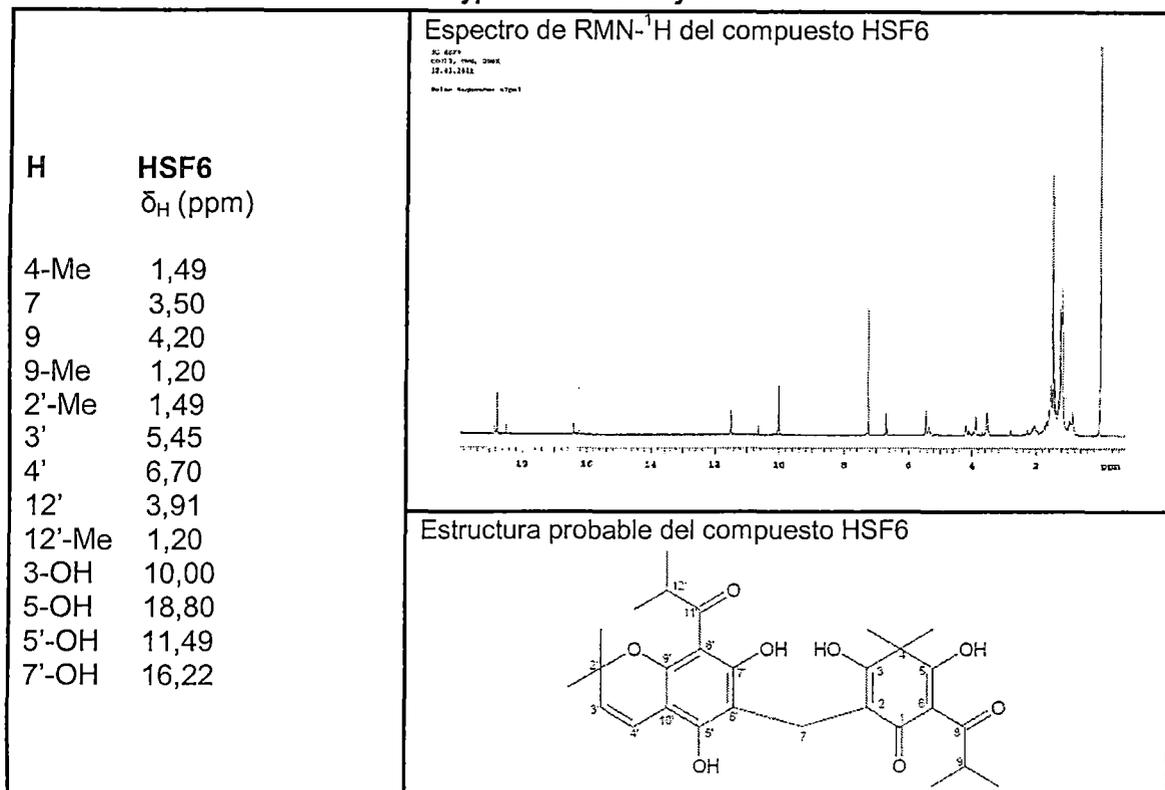
FUENTE: Propia.

**TABLA N°21.**  
**DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE RMN-<sup>1</sup>H DEL COMPUESTO HLF7 AISLADO DEL**  
*Hypericum laricifolium.*

H	HLF7 $\delta_H$ (ppm)	
4-Me	1,49	<p><b>Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto HLF7</b></p>  <p><b>Estructura probable del compuesto HLF7</b></p> 
7	3,50	
9	4,20	
9-Me	1,20	
2'-Me	1,49	
3'	5,45	
4'	6,70	
12'	3,91	
12'-Me	1,20	
3-OH	10,00	
5-OH	18,80	
5'-OH	11,49	
7'-OH	16,22	

FUENTE: Propia.

**TABLA N°22.**  
**DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE RMN-<sup>1</sup>H DEL COMPUESTO HSF6 AISLADO DEL**  
*Hypericum brevistylum.*



FUENTE: Propia.

### Análisis y discusión:

Analizando los espectros de RMN-<sup>1</sup>H (TABLAS N°19, 20, 21 y 22) de los compuestos aislados HAF3456(1), HBF5, HLF7 e HSF6, se puede apreciar que estos presentan estructuras químicas relacionadas. En los espectros puede observarse la presencia de cuatro tipos de señales. La primera ocurre a campo alto donde dos señales ( $\delta_H$  1.20 y 1.49 ppm) están duplicadas, refiriéndose a hidrógenos de grupos metilo ligados a C9 y C4, respectivamente. El segundo grupo está compuesto por tres señales con desplazamiento químico a 3.50, refiriéndose a hidrógenos de puente metilénica; 3.91 y 4.20 corresponden a grupos metilo ligados a C12' y C9. La presencia de un grupo vinilo se apoya en la presencia de una señal en 5.45 y 6.70. En el cuarto grupo de señales del espectro se observa el desplazamiento de cuatro señales intensas en campo bajo ( $\delta_H$  10.00; 11.49; 16.22 y 18.80 ppm) que corresponden a grupos hidroxilo. La señal a campo muy bajo ( $\delta_H$  18.80 ppm) en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de los compuestos analizados, corresponde al sistema enolizable formado por el grupo hidroxilo de C5 y el grupo carbonilo de C8, que es característico de

floroglucinoles ligados a unidades de ácido acil-filicínico. La presencia de un anillo dimetilbenzopirano en la estructura está indicada, en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de los compuestos analizados, por un par de dobletes en  $\delta_H$  5.45 y 6.70 ppm (atribuidos a hidrógenos vinílicos) y un singlete referido a dos metilos en C2' ( $\delta_H$  1.49 ppm).

Se ha reportado por FERRAZ *et al.*, 2002 y NÖR *et al.*, 2004 que el género *Hypericum* comprende más de 400 especies. Las especies presentes en América del Sur pertenecen a las secciones *Brathys* y *Trigynobrathys*. Las especies de este género tienen una fuerte tendencia a acumular compuestos fenólicos con un patrón de sustitución del floroglucinol. Del género *Hypericum* se conocen dos tipos de derivados del floroglucinol, los monoméricos, que pueden ser poliisoprenilados como la muy conocida hiperforina, y los floroglucinoles diméricos, que pueden incluir una cadena lateral prenilo o un anillo benzopirano dentro de su estructura.

Dentro de la sección *Brathys* se han aislado a las drummondinas A, B, C y D, E y F del *H. drummondii* por JAYASURIYA *et al.*, 1991 uliginosina A, hiperbrasilol C y saroaspidina A del *H. gentianoides* por BABKA *et al.*, 2010.

Por otro lado, dentro de la sección *Trigynobrathys* se han aislado la uliginosina A y B del *H. uliginosum* TAYLOR y BROOKER, 1969 los sarotralenos A, B, C, D, y G, sarotralina y japonicina A del *H. japonicum* por ISHIGURO *et al.*, 1986, japonicina A, uliginosina A, isouliginosina B, hiperbrasilol A, hiperbrasilol B, hiperbrasilol C e isohiperbrasilol B del *H. brasilinse* por ROCHA *et al.*, 1995, y ROCHA *et al.*, 1996 uliginosina B del *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum* por FERRAZ *et al.*, 2002 y NÖR *et al.*, 2004 e hiperbrasilol B del *H. caprifoliatum* e *H. connatum* por NÖR *et al.*, 2004.

Las secciones *Brathys* y *Trigynobrathys* incluyen especies de las cuales todos los derivados del floroglucinol aislados hasta el momento presentan estructuras diméricas formadas por unidades de ácido filicínico y de floroglucinol. Los resultados presentados en la presente coinciden con los resultados de investigaciones anteriores y refuerza la proposición de que estos compuestos podrían ser considerados como marcadores quimiotaxonómico para estas dos secciones, *Brathys* y *Trigynobrathys*.

**TABLA N°23.**

**DETERMINACIÓN DE LA DL<sub>50</sub> DEL EXTRACTO SECO ETANÓLICO DEL *Hypericum andinum* ADMINISTRADO AGUDAMENTE v.o. EN RATONES Balb/c/CNPB.**

SUSTANCIA	PRIMERA FASE			SEGUNDA FASE		
	Dosis (mg/kg)	Número de Ratones	Mortalidad en 24 hs	Dosis (mg/kg)	Número de Ratones	Mortalidad en 24 hs
Extracto seco etanólico del <i>Hypericum andinum</i>	10	3	-	1600	1	-
	100	3	-	2900	1	-
	1000	3	-	5000	1	-
Observaciones: sin cambios en el perfil psicofarmacológico.						
DL <sub>50</sub> para el extracto seco etanólico del <i>Hypericum andinum</i> = <b>mayor a 5000 mg/kg.</b>						

FUENTE: Hoja de recolección de datos.

**TABLA N°24.**

**DETERMINACIÓN DE LA DL<sub>50</sub> DEL EXTRACTO SECO ETANÓLICO DEL *Hypericum brevistylum* ADMINISTRADO AGUDAMENTE v.o. EN RATONES Balb/c/CNPB.**

SUSTANCIA	PRIMERA FASE			SEGUNDA FASE		
	Dosis (mg/kg)	Número de Ratones	Mortalidad en 24 hs	Dosis (mg/kg)	Número de Ratones	Mortalidad en 24 hs
Extracto seco etanólico del <i>Hypericum brevistylum</i>	10	3	-	1600	1	-
	100	3	-	2900	1	-
	1000	3	-	5000	1	-
Observaciones: sin cambios en el perfil psicofarmacológico.						
DL <sub>50</sub> para el extracto seco etanólico del <i>Hypericum brevistylum</i> = <b>mayor a 5000 mg/kg.</b>						

FUENTE: Hoja de recolección de datos.

**TABLA N°25.**

**DETERMINACIÓN DE LA DL<sub>50</sub> DEL EXTRACTO SECO ETANÓLICO DEL *Hypericum laricifolium* ADMINISTRADO AGUDAMENTE v.o. EN RATONES Balb/c/CNPB.**

SUSTANCIA	PRIMERA FASE			SEGUNDA FASE		
	Dosis (mg/kg)	Número de Ratones	Mortalidad en 24 hs	Dosis (mg/kg)	Número de Ratones	Mortalidad en 24 hs
Extracto seco etanólico del <i>Hypericum laricifolium</i>	10	3	-	1600	1	-
	100	3	-	2900	1	-
	1000	3	-	5000	1	-
Observaciones: sin cambios en el perfil psicofarmacológico.						
DL <sub>50</sub> para el extracto seco etanólico del <i>Hypericum laricifolium</i> = <b>mayor a 5000 mg/kg.</b>						

FUENTE: Hoja de recolección de datos.

TABLA N°26.

DETERMINACIÓN DE LA DL<sub>50</sub> DEL EXTRACTO SECO ÉTANÓLICO DEL *Hypericum silenoides* ADMINISTRADO AGUDAMENTE v.o. EN RATONES Balb/c/CNPB.

SUSTANCIA	PRIMERA FASE			SEGUNDA FASE		
	Dosis (mg/kg)	Número de Ratones	Mortalidad en 24 hs	Dosis (mg/kg)	Número de Ratones	Mortalidad en 24 hs
Extracto seco etanólico del <i>Hypericum laricifolium</i>	10	3	-	1600	1	-
	100	3	-	2900	1	-
	1000	3	-	5000	1	-
Observaciones: sin cambios en el perfil psicofarmacológico.						
DL <sub>50</sub> para el extracto seco etanólico del <i>Hypericum silenoides</i> = mayor a 5000 mg/kg.						

FUENTE: Hoja de recolección de datos.

### Análisis y discusión:

En las TABLAS N°23, 24, 25 y 26 se aprecia la determinación de los valores de DL<sub>50</sub> de los extractos secos etanólicos obtenidos de las partes aéreas en floración del *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium* e *H. silenoides* administrados agudamente por v.o., en ratones machos de la cepa Balb/c/CNPB. Ninguno de los extractos causó la muerte de los animales a las dosis de 10, 100, 1000, 1600, 2900 y 5000 mg/kg, por lo tanto estos pueden ser considerados como atóxicos.

Según DÉCIGA-CAMPOS *et al.*, 2007 la investigación de la toxicidad aguda es el primer paso en el análisis toxicológico y farmacológico de las drogas vegetales. Se ha reportado por SÁNCHEZ-MATEO *et al.*, 2002 que la administración de extractos metanólicos, por vía oral, del *H. canariense*, *H. glandulosum*, *H. grandifolium* e *H. reflexum*, en ratones albinos Swiss, no produjo manifestaciones tóxicas y se reportó que sus valores de DL<sub>50</sub> son mayores a 2000 mg/kg. Nuestros resultados demuestran que los extractos secos etanólicos de las partes aéreas en floración del *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium* e *H. silenoides* administrados en ratones BALB/C/CNPB presentan valores de DL<sub>50</sub> mayores a 5000 mg/kg. Dentro de las especies de la sección *Trygynobrathys* se ha reportado por MENDES *et al.*, 2002 que el *H. brasiliense* e *H. cordatum* presentan valores de DL<sub>50</sub> de 269 y 324 mg/kg, respectivamente, observándose disminución de la locomoción y ptosis palpebral en roedores. Sin embargo los extractos alcohólicos utilizados fueron administrados intraperitonealmente.

TABLA N°27.

PRINCIPALES SIGNOS DE NEUROTOXICIDAD TRAS LA ADMINISTRACIÓN DEL EXTRACTO SECO ETANÓLICO DEL *Hypericum brevistylum* (5000 mg/kg, v.o.).

Signos	Tiempo (minutos)						
	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	60 min	120 min
Letalidad	-	-	-	-	-	-	-
Sedación	# # #		1	2	2	3	3
Marcha anormal			+	+	+		
Pérdida del equilibrio				+	+		
Incoordinación motora			+	+	+		
Tasa de respiración				↓	↓	↓	↓
Reactividad al tacto				-	-	-	-
Tono muscular				-	-	-	-
Perdida del Reflejo de enderezamiento				+	+	+	+
Perdida de la fuerza de aprehensión					+	+	+
Acinesia						+	+
Analgesia						+	+

FUENTE: Hoja de recolección de datos.

LEYENDA: + Presencia, - Ausencia, ↓ Disminución, 1,2,3 Valores subjetivos de intensidad.

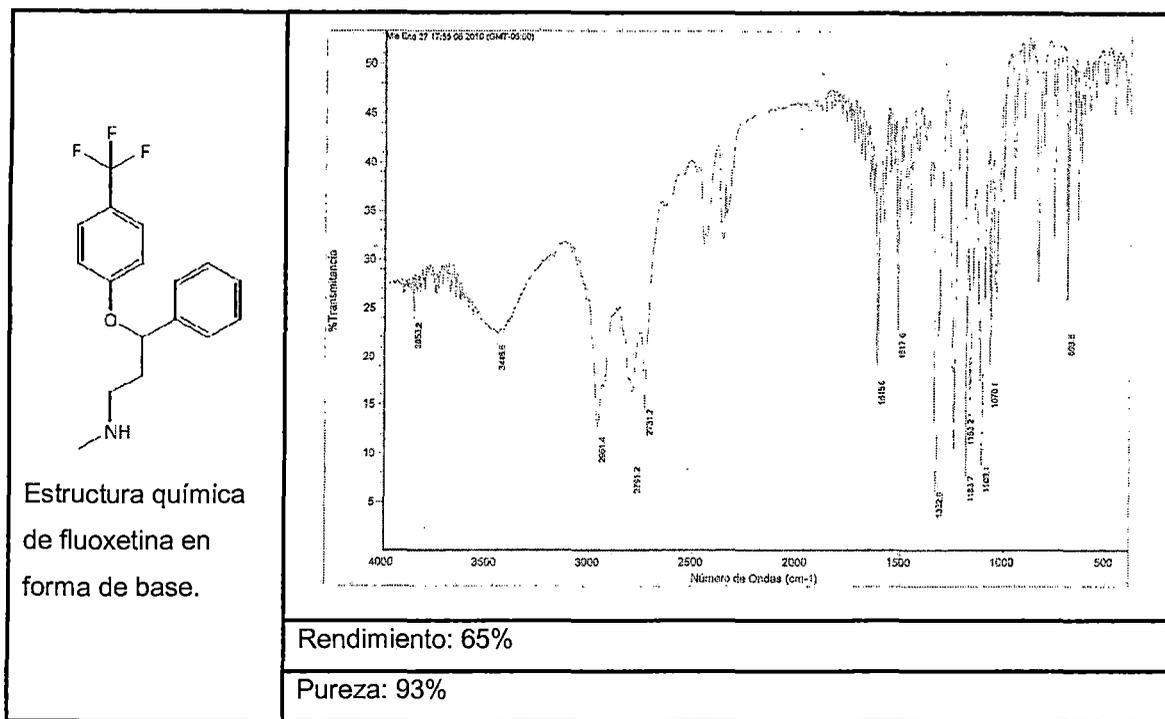
### Análisis y discusión:

Dentro de los diferentes extractos evaluados, se observó signos de neurotoxicidad apreciables únicamente en el grupo que recibió el extracto del *H. brevistylum*, observándose signos pronunciados de depresión del SNC (TABLA N°27) a la dosis de 5000 mg/kg. La sedación y la incoordinación motora fueron los primeros signos apreciados a los 15 minutos después de la administración del extracto. A los 60 y 120 minutos se observó una pronunciada sedación, disminución de la tasa de respiración, ausencia de la reactividad al tacto y pérdida completa del reflejo de enderezamiento y de la fuerza de aprehensión. Sin embargo no se observó letalidad.

Se ha reportado por IRWIN, 1968 y ROUX *et al.*, 2003 que la sedación, pérdida del balance, incoordinación motora, hiposensibilidad a estímulos externos; disminución del tono muscular, acinesia, etc., son conductas relacionadas a depresión del SNC. Por lo tanto el extracto seco etanólico del *H. brevistylum* ejerce un efecto depresor apreciable a la dosis de 5000 mg/kg.

TABLA N°28.

ESPECTRO IR, RENDIMIENTO Y PUREZA DE LA FLUOXETINA CLORHIDRATO AISLADA A PARTIR DE CAPSULAS COMERCIALES FLUOXETINA CLORHIDRATO DE 20 MG.



FUENTE: Propia.

**Análisis y discusión:**

En la TABLA N°28 se aprecia el espectro IR, rendimiento y pureza de la fluoxetina clorhidrato aislada a partir de capsulas comerciales de fluoxetina clorhidrato de 20 mg. Se logró un rendimiento del 65% y una pureza del 93%, en cantidad suficiente para la realización de los test de natación forzada. En el espectro IR de la fluoxetina se aprecia una absorción intensa en la región de  $3446\text{ cm}^{-1}$ , característico del alargamiento de átomos de hidrogeno unidos a un grupo amina secundaria (N-H), y  $2961$ ,  $2791$  y  $2731\text{ cm}^{-1}$ , característico de grupos de átomos de hidrogeno unidos a anillos aromáticos (C-H). Las bandas complejas presentes en la región de  $1200$  y  $700\text{ cm}^{-1}$  pertenecen a la región de huella digital del espectro IR de la fluoxetina clorhidrato.

El costo elevado de los antidepresivos (fluoxetina HCl: 50 mg a 319.50\$ en sigma-aldrich.com) para el desarrollo de pruebas preclínicas y clínicas ha llevado al desarrollo de metodologías por McCONATHY *et al.*, 2007 para el aislamiento de fármacos antidepresivos a partir de formulaciones farmacéuticas comerciales que son altamente disponibles, de uso rutinario y sustancialmente menos costosas.

**TABLA N°29.**

**CURVA DOSIS-RESPUESTA DE LA FLUOXETINA CLORHIDRATO ADMINISTRADO v.o. EN RATONES Balb/c/CNPB SOMETIDOS A LA PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA.**

Tratamiento	Dosis (v.o.) (mg/kg)	n	Tiempo de inmovilidad (media ± E.S.M.)(s)	Variación (%)
Control (C)	-	6	160.0 ± 4.08	-
Fluoxetina (F20)	20	6	120.0 ± 21.64	-25.00
Fluoxetina (F30)	30	5	68.0 ± 25.13 **	-57.50
Fluoxetina (F40)	40	6	107.5 ± 15.64	-32.81

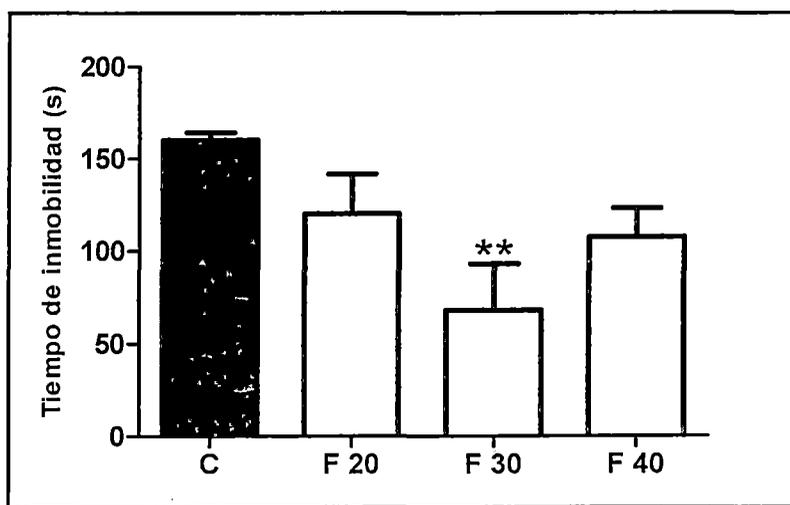
\*\* $p < 0.01$ , comparado con el grupo control (ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett).

**CUADRO ANOVA**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos	23670	3	7888	4.342	0.000
Dentro de grupos	34520	19	1817		
Total	58180	22			

**FIGURA N°28.**

**CURVA DOSIS-RESPUESTA DE LA FLUOXETINA CLORHIDRATO ADMINISTRADO v.o. EN RATONES Balb/c/CNPB SOMETIDOS A LA PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA.**



FUENTE: Propia.

## **Análisis y discusión:**

En la TABLA N°29 y FIGURA N°28 se aprecia el efecto de la fluoxetina administrado en tres dosis diferentes por vía oral en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la PNF. La fluoxetina a las dosis de 20, 30 y 40 mg/kg redujo el tiempo de inmovilidad de los roedores en 25.0, 57.50 y 32.81% respectivamente. Al comparar los diferentes tratamientos experimentales con el grupo control por análisis de varianza ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett se puede observar que existe diferencia significativa del grupo experimental que recibió fluoxetina a la dosis de 30 mg/kg ( $p < 0.01$ ) ente los cuatro grupos experimentales. Se observa que la administración de la fluoxetina administrada en ratones presenta una curva dosis-respuesta en forma de U, siendo 30 mg/kg la dosis que redujo en mayor porcentaje el tiempo de inmovilidad de los animales sometidos a la PNF.

La PNF fue introducida como un modelo animal sensible a tratamiento antidepresivo por **PORSOLT *et al.*, 1977a** y así posteriormente considerado como un modelo animal de depresión. La PNF es sensitiva a una amplia gama de antidepresivos clásicos, a los atípicos e inclusive a la terapia electroconvulsiva. Sin embargo uno de los principales inconvenientes de esta prueba era la falta de sensibilidad a los ISRS. Este hecho llevó al desarrollo de modificaciones en el procedentito original. Se ha reportado por **DETKE *et al.*, 1995**, **DETKE y LUCKI *et al.*, 1996** que el incremento en la profundidad del agua utilizada y del diámetro del cilindro incrementa su sensibilidad a los ISRS. Estos resultados condujeron al hallazgo de que no todas las cepas de ratas y ratones son sensibles al tratamiento con antidepresivos. Así se ha demostrado por **LUCKI *et al.*, 2001** y **CASTAGNÉ *et al.*, 2009** que la administración de fluoxetina en ratones de la cepa Bbalb/cJ sometidos a la PNF produce una curva dosis-respuesta con efecto máximo a la dosis de 10 mg/kg. Las cepas DBA/2J, NIH Swiss y NMRI mostraron sensibilidad a la fluoxetina a las dosis de 5, 50 y 32 mg/kg respectivamente. Las cepas CD-1, CF-1, A/j, C3H/HeJ y C57Bl/6J mostraron insensibilidad al tratamiento con fluoxetina. El presente estudio confirma que la administración de fluoxetina a diferentes dosis en ratones de la cepa Balb/c/CNPB del Instituto Nacional de Salud – Lima reduce el tiempo de inmovilidad generando una curva dosis-respuesta en forma de U que son características de los fármacos antidepresivos.

TABLA N°30.

**CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL EXTRACTO SECO ETANÓLICO DEL *Hypericum laricifolium* ADMINISTRADO v.o. EN RATONES Balb/c/CNPB SOMETIDOS A LA PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA.**

Tratamiento	Dosis (v.o.) (mg/kg)	n	Tiempo de inmovilidad (media ± E.S.M.)(s)	Variación (%)
Control (C)	-	10	202.0 ± 7.31	-
Fluoxetina (F30)	30	10	91.50 ± 19.25***	-54.70
<i>H. laricifolium</i> (HL1)	125	10	158.0 ± 15.11	-21.78
<i>H. laricifolium</i> (HL2)	250	10	139.5 ± 19.08*	-30.94
<i>H. laricifolium</i> (HL3)	500	9	175.6 ± 12.48	-13.06
<i>H. laricifolium</i> (HL4)	1000	8	123.1 ± 17.01**	-39.05

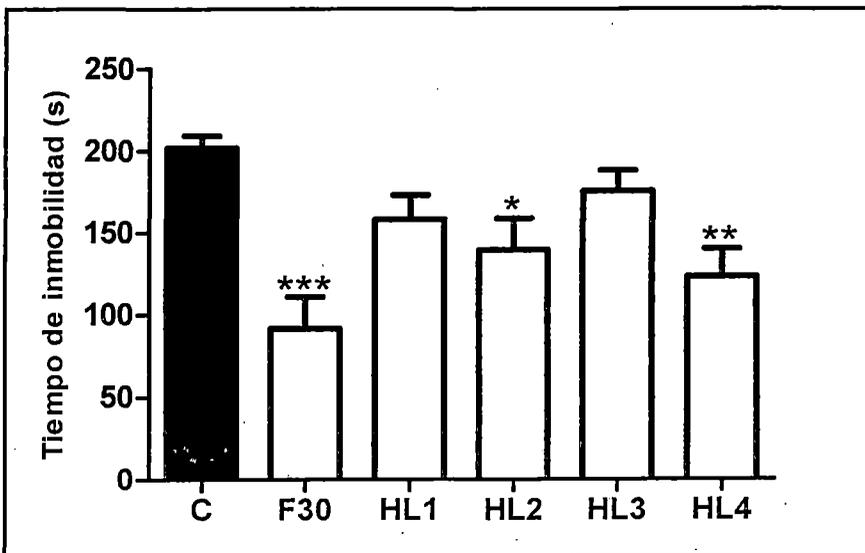
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , comparado con el grupo control (ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett).

**CUADRO ANOVA**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos	74560	5	14910	6.396	0.000
Dentro de grupos	118900	51	2332		
Total	193500	56			

FIGURA N°29.

**CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL EXTRACTO SECO ETANÓLICO DEL *Hypericum laricifolium* ADMINISTRADO v.o. EN RATONES Balb/c/CNPB SOMETIDOS A LA PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA.**



FUENTE: Propia.

TABLA N°31.

CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL EXTRACTO SECO ETANÓLICO DEL *Hypericum andinum* ADMINISTRADO v.o. EN RATONES Balb/c/CNPB SOMETIDOS A LA PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA.

Tratamiento	Dosis (v.o.) (mg/kg)	n	Tiempo de inmovilidad (media ± E.S.M.)(s)	Variación (%)
Control (C)	-	10	202.0 ± 7.31	-
Fluoxetina (F30)	30	10	91.50 ± 19.25***	-54.70
<i>H. andinum</i> (HA1)	125	10	131.5 ± 18.68**	-35.15
<i>H. andinum</i> (HA2)	250	9	115.0 ± 9.20***	-43.07
<i>H. andinum</i> (HA3)	500	10	120.5 ± 12.21***	-40.35
<i>H. andinum</i> (HA4)	1000	10	154.5 ± 10.99	-23.51

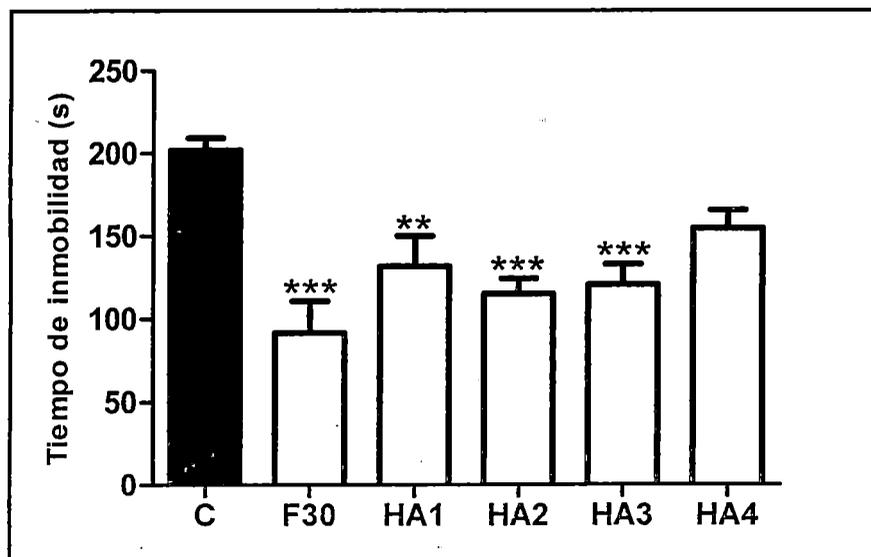
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , comparado con el grupo control (ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett).

CUADRO ANOVA

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos	73360	5	14670	7.779	0.000
Dentro de grupos	99960	53	1886		
Total	173300	58			

FIGURA N°30.

CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL EXTRACTO SECO ETANÓLICO DEL *Hypericum andinum* ADMINISTRADO v.o. EN RATONES Balb/c/CNPB SOMETIDOS A LA PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA.



FUENTE: Propia.

TABLA N°32.

**CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL EXTRACTO SECO ETANÓLICO DEL *Hypericum brevistylum* ADMINISTRADO v.o. EN RATONES Balb/c/CNPB SOMETIDOS A LA PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA.**

Tratamiento	Dosis (v.o.) (mg/kg)	n	Tiempo de inmovilidad (media ± E.S.M.)(s)	Variación (%)
Control (C)	-	10	202.0 ± 7.31	-
Fluoxetina (F30)	30	10	91.50 ± 19.25***	-54.70
<i>H. brevistylum</i> (HB1)	125	10	168.0 ± 10.65	-16.83
<i>H. brevistylum</i> (HB2)	250	9	83.89 ± 15.76***	-58.47
<i>H. brevistylum</i> (HB3)	500	9	156.1 ± 15.76	-22.77
<i>H. brevistylum</i> (HB4)	1000	9	131.1 ± 17.75*	-35.10

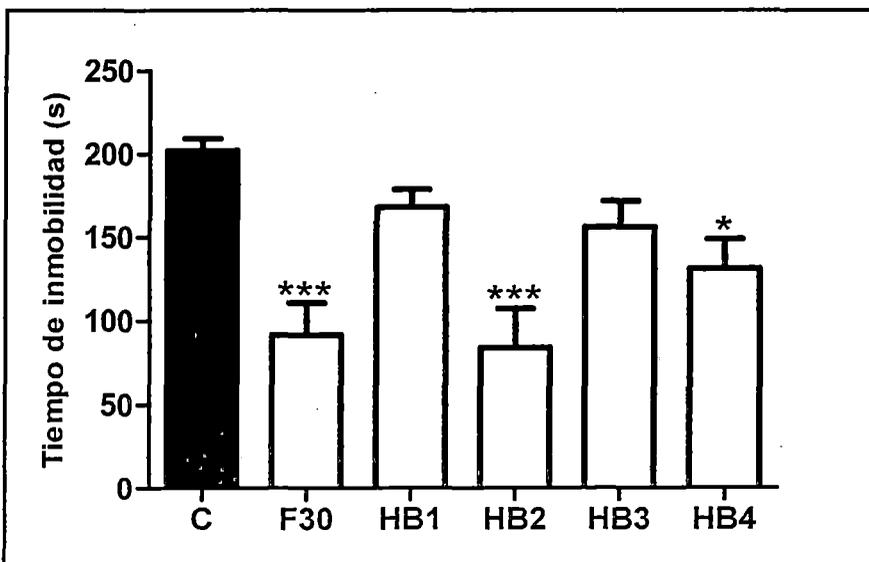
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , comparado con el grupo control (ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett).

**CUADRO ANOVA**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos	101200	5	20230	8.044	0.000
Dentro de grupos	128300	51	2515		
Total	229500	56			

FIGURA N°31.

**CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL EXTRACTO SECO ETANÓLICO DEL *Hypericum brevistylum* ADMINISTRADO v.o. EN RATONES Balb/c/CNPB SOMETIDOS A LA PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA.**



FUENTE: Propia.

TABLA N°33.

**CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL EXTRACTO SECO ETANÓLICO DEL *Hypericum silenoides* ADMINISTRADO v.o. EN RATONES Balb/c/CNPB SOMETIDOS A LA PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA.**

Tratamiento	Dosis (v.o.) (mg/kg)	n	Tiempo de inmovilidad (media ± E.S.M.)(s)	Variación (%)
Control (C)	-	10	202.0 ± 7.31	-
Fluoxetina (F30)	30	10	91.50 ± 19.25***	-54.70
<i>H. silenoides</i> (HS1)	125	10	150.5 ± 8.865	-25.49
<i>H. silenoides</i> (HS2)	250	9	188.9 ± 11.78	-6.49
<i>H. silenoides</i> (HS3)	500	9	93.89 ± 21.09***	-53.52
<i>H. silenoides</i> (HS4)	1000	10	131.5 ± 17.83**	-34.90

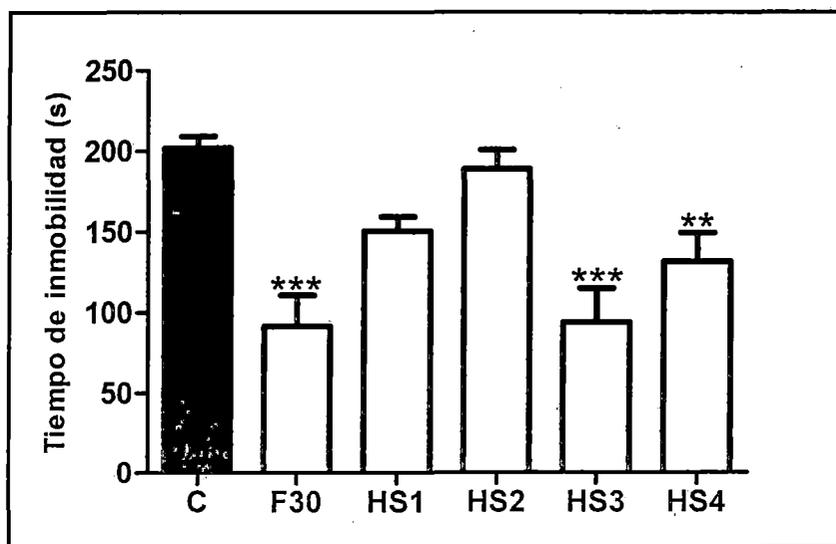
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , comparado con el grupo control (ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett).

**CUADRO ANOVA**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos	103900	5	20780	9.324	0.000
Dentro de grupos	115900	52	2228		
Total	219700	57			

FIGURA N°32.

**CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL EXTRACTO SECO ETANÓLICO DEL *Hypericum silenoides* ADMINISTRADO v.o. EN RATONES Balb/c/CNPB SOMETIDOS A LA PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA.**



FUENTE: Propia.

## Análisis y discusión:

En la TABLA N°30y FIGURA N°29 se aprecia el efecto del extracto seco etanólico de las partes aéreas en floración del *H. laricifolium* administrado en dosis crecientes por vía oral en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la PNF. Los extractos del *H. laricifolium* a las dosis de 125, 250, 500 y 1000 mg/kg redujeron el tiempo de inmovilidad de los roedores en 21.78, 30.94, 13.06 y 39.05% respectivamente. Al comparar los diferentes tratamientos experimentales con el grupo control negativo por análisis de varianza ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett se puede observar que existe diferencia significativa del grupo control positivo que recibió fluoxetina a la dosis de 30 mg/kg ( $p<0.001$ ) y aquellos que recibieron extracto de *H. laricifolium* a las dosis de 250 mg/kg ( $p<0.05$ ) y 1000 mg/kg ( $p<0.01$ ) entre los seis grupos experimentales. Ninguno de los extractos del *H. laricifolium* mostró efecto estadísticamente comparable con el grupo control positivo. Así se observa que el extracto seco etanólico de las partes aéreas en floración del *H. laricifolium* presenta actividad de tipo antidepresivo a las dosis de 250 y 1000 mg/kg en la PNF en ratones Balb/c/CNPB.

En la TABLA N°31 y FIGURA N°30 se aprecia el efecto del extracto seco etanólico de las partes aéreas en floración del *H. andinum* administrado en dosis crecientes por vía oral en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la PNF. El extracto del *H. andinum* a las dosis de 125, 250, 500 y 1000 mg/kg redujo el tiempo de inmovilidad de los roedores en 35.15, 43.07, 40.35 y 23.51% respectivamente. Al comparar los diferentes tratamientos experimentales con el grupo control negativo por análisis de varianza ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett se puede observar que existe diferencia significativa del grupo control positivo que recibió fluoxetina a la dosis de 30 mg/kg ( $p<0.001$ ) y aquellos que recibieron extracto de *H. andinum* a las dosis de 125 ( $p<0.01$ ), 250 ( $p<0.001$ ) y 500 ( $p<0.001$ ) mg/kg entre los seis grupos experimentales. El extracto del *H. andinum* a las dosis de 125, 250 y 500 mg/kg mostró efecto estadísticamente comparable con el grupo control positivo. Así se observa que el extracto seco etanólico del *H. andinum* presenta actividad de tipo antidepresivo a las dosis de 125, 250 y 500 mg/kg en la PNF en ratones Balb/c/CNPB. La curva dosis respuesta en forma de U observada es característica de sustancia antidepresivas.

En la TABLA N°32 y FIGURA N°31 se aprecia el efecto del extracto seco etanólico de las partes aéreas en floración del *H. brevistylum* administrado en dosis crecientes por vía oral en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la PNF. El extracto del *H. brevistylum* a las dosis de 125, 250, 500 y 1000 mg/kg redujo el tiempo de inmovilidad de los roedores en 16.83, 58.47, 22.77 y 35.10% respectivamente. Al comparar los diferentes tratamientos experimentales con el grupo control negativo por análisis de varianza ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett se puede observar que existe diferencia significativa del grupo control positivo que recibió fluoxetina a la dosis de 30 mg/kg ( $p<0.001$ ) y aquellos que recibieron extracto de *H. brevistylum* a las dosis de 250 ( $p<0.001$ ) y 1000 ( $p<0.05$ ) mg/kg entre los seis grupos experimentales. El extracto del *H. brevistylum* a las dosis de 250 mg/kg mostró efecto estadísticamente comparable con el grupo control positivo. Así se observa que el extracto seco etanólico del *H. brevistylum* presenta actividad de tipo antidepresivo a las dosis de 250 y 1000 mg/kg en la PNF en ratones Balb/c/CNPB.

En la TABLA N°33 y FIGURA N°32 se aprecia el efecto del extracto seco etanólico de las partes aéreas en floración del *H. silenoides* administrado en dosis crecientes por vía oral en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la PNF. El extracto del *H. silenoides* a las dosis de 125, 250, 500 y 1000 mg/kg redujo el tiempo de inmovilidad de los roedores en 25.49, 6.49, 53.52 y 34.90% respectivamente. Al comparar los diferentes tratamientos experimentales con el grupo control negativo por análisis de varianza ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett se puede observar que existe diferencia significativa del grupo control positivo que recibió fluoxetina a la dosis de 30 mg/kg ( $p<0.001$ ) y aquellos que recibieron extracto de *H. silenoides* a las dosis de 500 ( $p<0.001$ ) y 1000 ( $p<0.01$ ) mg/kg entre los seis grupos experimentales. El extracto del *H. silenoides* a las dosis de 500 mg/kg mostró efecto estadísticamente comparable con el grupo control positivo. Así se observa que el extracto seco etanólico del *H. brevistylum* presenta actividad de tipo antidepresivo a la dosis de 500 mg/kg en la PNF en ratones Balb/c/CNPB. La curva dosis respuesta en forma de U observada es característica de sustancia antidepresivas.

Se ha reportado por SUZUKI *et al.*, 1984 y BLADT y WAGNER, 1994 que los extractos alcohólicos del *H. perforatum* inhiben a la enzima MAO-A y MAO-B. Dentro de los constituyentes de estos extractos alcohólicos se ha demostrado por que los flavonoides, quercetina, quercitrina y la 1,3,6,7-xantona, mas no la hipericina ni hiperforina, serian los responsables del efecto inhibitorio observado sobre las MAOs. Sin embargo, a pesar de muchos estudios han demostrado la presencia de inhibidores de MAO en los extractos de *H. perforatum*, sus relativas elevadas concentraciones inhibitorias niegan la relevancia del efecto inhibitorio sobre las MAOs en el efecto antidepresivo clínicamente demostrado de los extractos alcohólicos del *H. perforatum*.

Más tarde, se ha demostrado, en estudios *in vitro*, por CHATTERJEE *et al.*, 1998, que el extracto alcohólico del *H. perforatum* inhibe la recaptación de serotonina, noradrenalina y dopamina con un efecto comparable a los antidepresivos sintéticos fluoxetina e imipramina. Dentro de los metabolitos presentes en este extracto se ha demostrado por WONNENMANN *et al.*, 2001 y JENSEN *et al.*, 2001 que tanto el extracto enriquecido de hiperforina (extracto supercrítico de CO<sub>2</sub>), la hiperforina pura e la adhiperforina inhiben la recaptación de serotonina, noradrenalina y dopamina con una potencia comparable al de los antidepresivos sintéticos. Adicionalmente, BUTTERWECK *et al.*, 2002, ha demostrado que la amentoflavona inhibe significativamente a los receptores 5HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, D<sub>3</sub> de dopamina, y la hipericina presenta actividad significativa sobre de receptores de dopamina D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>, y la hiperforina obre receptores de dopamina D<sub>1</sub>.

Por otro lado, se ha demostrado por BUTTERWECK *et al.*, 2000 que los extracto alcohólico del *H. perforatum* a las dosis de 125, 250, 500 y 1000 mg/kg reducen significativamente el tiempo de inmovilidad en la PNF en ratas, mostrando así una curva dosis respuesta en forma de U. Este extracto contenía flavonoides, en especial hiperósido, quercitrina e isoquercitrina, naftodiantronas, hipericina y pseudohipericina, y el floriglucinol hiperforina. Los extractos metanólicos del *H. canariense*, *H. glandulosum*, *H. grandifolium* e *H. reflexum*, también han sido evaluados por SÁNCHEZ-MATEO *et al.*, 2002 en diferentes pruebas de actividad antidepresiva observándose una clara reducción del tiempo de inmovilidad de los ratones que recibieron dichos extractos a las dosis de 500 y 1000 mg/kg sometidos a la PNF. Los extractos

utilizados fueron caracterizados posteriormente por SÁNCHEZ-MATEO *et al.*, 2005, SÁNCHEZ-MATEO *et al.*, 2007, BONKANKA *et al.*, 2008 y SÁNCHEZ-MATEO *et al.*, 2009 observándose la presencia de flavonoides y antraquinonas en el *H. canariense*, *H. glandulosum* e *H. reflexum*, mientras que el *H. grandifolium* mostró la presencia de los flavonoides quercetina, quercitrina e hiperósido, ausencia de antraquinonas y la presencia del floroglucinol hiperforina. También se ha reportado por DAUDT *et al.*, 2000 y VIANA *et al.*, 2005 que el extracto metanólico y la fracción de hexano del *H. caprifoliatum* a la dosis de 270 mg/kg/día recuden significativamente el tiempo de inmovilidad en la PNF en ratas. Estos extractos contenían compuestos fenólicos principalmente flavonoides y floroglucinoles. También se ha reportado por STEIN *et al.*, 2010 que el extracto de ciclohexano del *H. polyanthemum* reduce el tiempo de inmovilidad la PNF a dosis superiores de 45 mg/kg en ratones. Este extracto mostro la presencia principalmente de floroglucinoles diméricos. Recientemente se ha demostrado por WANG *et al.*, 2010 que el extracto hidroalcohólico del *H. enshiense* a las dosis de 250 y 500 mg/kg redujo el tiempo de inmovilidad en ratones sometidos a la PNF. Se demostró la presencia de los flavonoides rutina, quercetina e hiperósido y de la naftodiantrona hipericina dentro del extracto utilizado.

Finalmente, se ha reportado por BUTTERWECK *et al.*, 2000, HAAS *et al.*, 2009 y HAAS *et al.*, 2010 que el flavonoide hiperósido aislado del *H. perforatum* e *H. caprifoliatum* reduce el tiempo de inmovilidad en la PNF a dosis de 10 y 20 mg/kg en ratones y 0.6, 1.3 y 1.8 mg/kg/día en ratas. Por otro lado BUTTERWECK *et al.*, 1998 ha reportado que la hipericina asilada del *H. perforatum* reduce el tiempo de inmovilidad en la PNF a la dosis de 0.23 mg/kg/día en ratas. El floroglucinol hiperforina aislado por ZALONI *et al.*, 2002 del *H. perforatum* también ha demostrado actividad en la PNF en ratas a la dosis de 3, 5 y 10 mg/kg. Recientemente STEIN *et al.*, 2010 reportó el aislamiento de la uliginosina B del *H. polyanthemum* que ha mostrado actividad en la PNF en ratones a dosis superiores de 5 mg/kg.

En el presente estudio se demuestra que los extractos secos etanólicos del *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium* e *H. silenoides* reducen significativamente el tiempo de inmovilidad al ser administrados en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la PNF. Adicionalmente los extracto del *H. andinum*

e *H. silenoides* mostraron curvas dosis-respuesta en forma de U, características de sustancias con propiedades antidepresivas. La caracterización química de los extractos utilizados mostró la presencia principalmente de flavonoides, hiperósido, ácidos fenólicos, ácido clorogénico, xantonas y floroglucinoles diméricos. El flavonoide hiperósido, los floroglucinoles diméricos y las xantonas presentes en los extractos representan los componentes que con mayor probabilidad contribuyen al efecto antidepresivo mostrado por los diferentes extractos. Las diferencias cuantitativas de los componentes de los diferentes extractos explicarían los diferentes grados de actividad de tipo antidepresivo observado entre los cuatro extractos analizados en el presente estudio.

# **CONCLUSIONES**

De la investigación realizada con los extractos secos etanólicos obtenidos de las partes aéreas en floración del *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium* e *Hypericum silenoides* se concluye:

Los extractos secos etanólicos obtenidos de las partes aéreas en floración del *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium* e *Hypericum silenoides* están constituidos principalmente por flavonoides, derivados del ácido cafeico, floroglucinoles diméricos y xantonas en menor medida.

Los extractos secos etanólicos obtenidos de las partes aéreas en floración del *Hypericum andinum*, *Hypericum laricifolium* e *Hypericum silenoides* no ocasionan efectos tóxicos agudos al ser administrados por vía oral en ratones Balb/c/CNPB hasta la dosis de 5000mg/kg. El extracto del *Hypericum brevistylum* fue el único que presentó efectos tóxicos agudos apreciables a la dosis de 5000 mg/kg.

La cepa de ratones Balb/c/CNPB es sensible a tratamiento antidepresivo con fluoxetina clorhidrato en la prueba de natación forzada, observándose una curva dosis respuesta en forma de U con una reducción máxima del tiempo de inmovilidad a la dosis de 30 mg/kg.

Los extractos secos etanólicos obtenidos de las partes aéreas en floración del *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum laricifolium* e *Hypericum silenoides*, fueron administrados en dosis crecientes por vía oral en ratones Balb/c/CNPB sometidos a la prueba de natación forzada, observándose que los diferentes tratamientos del *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum* e *Hypericum silenoides* reducen significativamente el tiempo de inmovilidad de los animales sometidos a la prueba de natación forzada apreciándose curvas dosis respuesta en forma de U indicativo de drogas con propiedades antidepresivas.

# **RECOMENDACIONES.**

### **A las autoridades:**

1. Realizar la implementación de laboratorios universitarios destinados exclusivamente a la investigación científica, promover la apertura de líneas de investigación en productos naturales con énfasis en plantas alto andinas y destinar los recursos de infraestructura e incentivos económicos necesarios para la sostenibilidad de estos laboratorios.

### **A los docentes:**

2. Buscar convenios con Institutos, Universidades y Centros de Investigación dedicados a la investigación botánica, fitoquímica y farmacológica de plantas medicinales.

3. Procurar la creación de un Instituto de Investigación para el estudio exclusivo de plantas medicinales alto andinas dentro de la carrera de Farmacia y Bioquímica.

4. Solicitar la implementación de laboratorios destinados exclusivamente al estudio botánico, fitoquímico y farmacológico de plantas medicinales alto andinas.

### **A los investigadores:**

5. Realizar la cuantificación de flavonoides, ácidos fenólicos, xantonas y floroglucinoles presentes en los extractos secos etanólicos del *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium* e *H. silenoides*.

6. Realizar un estudio de aislamiento de sustancias guiado por bioensayo (prueba de natación forzada) a partir de los extractos secos etanólicos del *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium* e *H. silenoides*, para determinar el o los posibles metabolitos responsables de la actividad antidepresiva.

7. Realizar estudios de interacción farmacológica para determinar el posible mecanismo de acción de los extractos secos etanólicos obtenidos del *H. andinum*, *H. brevistylum*, *H. laricifolium* e *H. silenoides*.

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. **ABREU IN, REIS MG, MARSAIOLI AJ, MAZZAFERA P. (2004)** Essential oil composition of *Hypericum brasiliense* Choise. **Flavour and Fragrance Journal**. 19(1): 80-82
2. **AKISKAL HS, McKINNEY WT. (1973)** Depressive disorders: toward a unified hypothesis. **Science**. 182(107): 20-29
3. **AVATO P.** A survey on the *Hypericum* genus: secondary metabolites and bioactivity. In: Atta-ur-Rahman, Editor. **Studies in Natural Products Chemistry**. The Netherlands: Elsevier; 2005: vol. 30, 603-634
4. **BABKA HL, HILLWIG ML, PRICE J, MAURY W, ILARSLAN H, WU L, WURTELE ES. (2010)** *Hypericum gentianoides* produces bioactive compounds in schizogenously formed glands. **Microscopy and Microanalysis**. 16(Supplement2): 1160-1161
5. **BERTON O, NESTLER EJ. (2006)** New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Reviews Neuroscience**. 7(2): 137-151
6. **BLADT S, WAGNER H. (1994)** Inhibition of MAO by fractions and constituents of *Hypericum* extract. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**. 7(Supplement1): 57-59
7. **BONKANKA CX, SMELCEROVIC A, ZUEHLKE S, RABANAL RM, SPITELLER M, SÁNCHEZ-MATEO CC. (2008)** HPLC-MS analysis and anti-oedematogenic activity of *Hypericum grandifolium* Choisy (Hypericaceae). **Planta Medica**. 74(7): 719-725
8. **BONNET U. (2002)** Moclobemide: Evolution, pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. **CNS Drug Reviews**. 8(3): 283-308
9. **BORSINI F, MELI A. (1988)** Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology**. 94(2):147-160
10. **BUTTERWECK V, WALL A, LIEFLÄNDER-WULF U, WINTERHOFF H, NAHRSTEDT A. (1997)** Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. **Pharmacopsychiatry**. 30 (Supplement 2): 117-124
11. **BUTTERWECK V, PETEREIT F, WINTERHOFF H, NAHRSTEDT A. (1998)** Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. **Planta Medica**. 64(4): 291-294
12. **BUTTERWECK V, JÜRGENLIEMK G, NAHRSTEDT A, WINTERHOFF H. (2000)** Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. **Planta Medica**. 66(1): 3-6

13. BUTTERWECK V, NAHRSTEDT A, EVANS J, HUFSEISEN S, RAUSER L, SAVAGE J, POPADAK B, ERNSBERGER P, ROTH BL. (2002) In vitro receptor screening of pure constituents of St. John's wort reveals novel interactions with a number of GPCRs. **Psychopharmacology**. 162(2): 193-202
14. BUTTERWECK V. (2003a) Mechanism of action of St John's wort in depression. **CNS Drugs**. 17(8): 539-562
15. BUTTERWECK V, NAHRSTEDT A. (2003b) Phytochemie und Pharmakologie: Was ist bekannt über Johanniskraut?. **Pharmazie in unserer Zeit**. 32(3): 212-219
16. CASTAGNÉ V, PORSOLT RD, MOSER P. (2009) Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. **European Journal of Pharmacology**. 616(1-3): 128–133
17. CHATTERJEE SS, BHATTACHARYA SK, WONNEMANN M, SINGER A, MÜLLER WE. (1998) Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. **Life Sciences**. 63(6): 499-510
18. CHOISY J D. (1821) Prodromus d'une monographie de la famille des Hypéricacées. Geneva.
19. CROCKETT SL, SCHANEBERG B, KHAN IA. (2005) Phytochemical profiling of new and old world *Hypericum* (St. John's Wort) species. **Phytochemical Analysis**. 16(6): 479-485
20. CROCKETT S, EBERHARDT M, KUNERT O, SCHÜHLY W. (2010) *Hypericum* species in the Páramos of Central and South America: a special focus upon *H. irazuense* Kuntze ex N. Robson. **Phytochemistry reviews**. 9(2): 255-269
21. DALL'AGNOL R, FERRAZ A, BERNARDI AP, ALBRING D, NÖR C, SCHAPOVAL EES, VON POSER GL. (2005) Bioassay-guided isolation of antimicrobial benzopyrans and phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species. **Phytotherapy Research**. 19(4): 291-293
22. DAUDT R, VON POSER GL, NEVES G, RATES SMK (2000) Screening for the antidepressant activity of some species of *Hypericum* from south Brazil. **Phytotherapy Research**. 14(5): 344-346
23. DÉCIGA-CAMPOS M, RIVERO-CRUZ I, ARRIAGA-ALBA M, CASTAÑEDA-CORRAL G, ANGELES-LÓPEZ GE, NAVARRETE A, MATA R. (2007) Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. 110(2): 334-342
24. DEMIRKIRAN O. (2007) Xanthenes in *Hypericum*: synthesis and biological activities. **Topics in Heterocyclic Chemistry**. 9: 139-178

25. **DETKE MJ, RICKELS M, LUCKI I. (1995)** Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**. 121(1): 66-72
26. **DETKE MJ, LUCKI I. (1996)** Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. **Behavioural Brain Research**. 73(1-2):43-46
27. **DEUSSING JM. (2006)** Disorders of the central nervous system. Animal models of depression. **Drug Discovery Today: Disease Models**. 3(4): 375-383
28. **FERRAZ ABF, BORDIGNON S, MANS DRA, SCHMITT A, RAVAZZOLO AP, VON POSER GL. (2002a)** Screening for the Presence of Hypericins in Southern Brazilian Species of *Hypericum*. **Pharmaceutical Biology**. 40(4): 294-297
29. **FERRAZ ABF, SCHRIPSEMA J, POHLMANN AR, VON POSER GL. (2002b)** Uliginosin B from *Hypericum myrianthum*. **Biochemical Systematics and Ecology**. 30(10): 989-991
30. **FERRAZ ABF, LIMBERGER RP, BORDIGNON SAL, VON POSER GL, HENRIQUES AT. (2005)** Essential oil composition of six *Hypericum* species from southern Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**. 20(3): 335-339
31. **GAEDCKE F. (2003)** Herstell- und Qualitätsaspekte pflanzlicher Extrakte, Beispiel: Johanniskraut. **Pharmazie in Unserer Zeit**. 32(3): 192-201
32. **GANZERA M, ZHAO J, KHAN IA. (2002)** *Hypericum perforatum* - Chemical profiling and quantitative results of St. John's wort products by an improved high-performance liquid chromatography method. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 91(3): 623-630
33. **GNERRE C, VON POSER GL, FERRAZ A, VIANA A, TESTA B, RATES SMK. (2001)** Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to south Brazil. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 53(9): 1273-1279
34. **HAAS JS, BETTI AH, STOLZ ED, STEIN AC, GRAZZIOTIN L, VON POSER GL, RATES SMK. (2009)** Phychofarmacological screening of hyperoside, a flavonoid isolated from *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schlttdl. Encontro Anual do Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS. 26, 27 e 28 de novembro de 2009. QPN-11
35. **HAAS JS, STOLZ ED, BETTI AH, STEIN AC, SCHRIPSEMA J, VON POSER GL, RATES SMK. (2010)** The anti-immobility effect of hyperoside on the forced swimming test in rats is mediated by the d2-like receptors activation. **Planta Medica**. DOI 10.1055/s-0030-1250386

36. HILLWIG ML, HAMMER KDP, BIRT D, WURTELE ES. (2008) Characterizing the metabolic fingerprint and anti-inflammatory activity of *Hypericum gentianoides*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56(12): 4359-4366
37. HOSTETTMANN K, WOLFENDER JL. Phytochemistry. In: Müller WE Editor. St. Jhon's Wort and its Active Principles in Depression and Anxiety. Switzerland: Birkhäuser Verlag; 2005: 5-20
38. IRWIN S. (1968) Comprehensive observational assessment: IA A systematic quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. **Psychopharmacologia**. 13(3): 222-257
39. ISHIGURO K, YAMAKI M, KASHIHARA M, TAKAGI S. (1986) Sarothralen A and B, new antibiotic compounds from *Hypericum japonicum*. **Planta Medica**. 52(4): 288-290
40. ISHIGURO K, YAMAKI M, KASHIHARA M, TAKAGI S. (1987) Saroaspidin A, B and C: additional antibiotic compounds from *Hypericum japonicum*. **Planta Medica**. 53(5): 415-417
41. ISHIGURO K, NAGATA S, FUKUMOTO H, YAMAKI M, ISOI K, YAMAGATA Y. (1994) A 2-pyrone derivative from *Hypericum japonicum*. **Phytochemistry**. 37(1): 283-284
42. JAYASURIYA H, McCHESNEY JD, SWANSON SM, PEZZUTO JM (1989) Antimicrobial and cytotoxic activity of rottlerin-type compounds from *Hypericum drummondii*. **Journal of Natural Products**. 52(2): 325-331
43. JAYASURIYA H, CLARK AM, McCHESNEY JD. (1991) New antimicrobial filicinic acid derivatives from *Hypericum drummondii*. **Journal of Natural Products**. 54(5): 1314-1320
44. JENSEN AG, HANSEN SH, NIELSEN EØ. (2001) Adhyperforin as a contributor to the effect of *Hypericum perforatum* L. in biochemical models of antidepressant activity. **Life Sciences**. 68(14): 1593-1605
45. KASPER S. Clinical efficacy in depression. In: Müller WE Editor. St. Jhon's Wort and its Active Principles in Depression and Anxiety. Switzerland: Birkhäuser Verlag; 2005: 123-131
46. KASPER S, HAMON M. (2009) Beyond the monoaminergic hypothesis: agomelatine, a new antidepressant with an innovative mechanism of action. **The World Journal of Biological Psychiatry**. 10(2): 117-26
47. KASPER S, CARACI F, FORTI B, DRAGO F, AGUGLIA E. (2010) Efficacy and tolerability of *Hypericum* extract for the treatment of mild to moderate depression. **European Neuropsychopharmacology**. 20(11): 747-765

48. KUHN R. (1958) The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). **The American Journal of Psychiatry.** 115(5): 459-464
49. LÓPEZ-MUÑOZ F, ALAMO C, JUCKEL G, ASSION HJ. (2007) Half a century of antidepressant drugs: on the clinical introduction of monoamine oxidase inhibitors, tricyclics, and tetracyclics. Part I: monoamine oxidase inhibitors. **Journal of Clinical Psychopharmacology.** 27(6): 555-559
50. LÓPEZ-MUÑOZ F, ALAMO C. (2009) Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. **Current Pharmaceutical Design.** 15(14): 1563-1586
51. LORKE D. (1983) A new approach to practical acute toxicity testing. **Archives of Toxicology.** 54(4):275-87
52. LUCKI I, DALVI A, MAYORGA AJ. (2001) Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. **Psychopharmacology.** 155(3): 315-322
53. MATHIS C, OURISSON G. (1963) Étude chimio-taxonomique du genre *Hypericum* I. Répartition de l'hypericine. **Phytochemistry.** 2(2): 157-171
54. MENDES FR, MATTEI R, DE ARAÚJO CARLINI EL. (2002) Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. **Fitoterapia.** 73(6): 462-471
55. MICHAUD CM, MURRAY CJL, BLOOM BR. (2001) Burden of disease – implications for future research. **Journal of the American Medical Association.** 285(5): 535-539
56. MÜLLER WE. Introduction and historical overview. In: Müller WE Editor. *St. John's Wort and its Active Principles in Depression and Anxiety.* Switzerland: Birkhäuser Verlag; 2005: 1-4
57. NASH J, NUTT D. (2004) Antidepressants. **Psychiatry.** 3(7): 22-26
58. NASH J, NUTT D. (2007) Antidepressants. **Psychiatry.** 6(7): 289-294
59. NAHRSTEDT A, BUTTERWECK V. (2010) Lessons learned from herbal medicinal products: the example of St. John's Wort. **Journal of Natural Products.** 73(5): 1015-1021
60. NÖR C, ALBRING D, FERRAZ ABF, SCHRIPEMA J, PIRES V, SONNET P, GUILLAUME D, VON POSER GL. (2004) Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the *Trigynobrathys* section. **Biochemical Systematics and Ecology.** 32(5): 517-519
61. NÖR (2006) Análise química e taxonômica de espécies de *hypericum* e avaliação da atividade antiangiogênica. Universidade Federal do Rio Grande

do Sul. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. [Tese de Mestrado].

62. NUNES JM, PINTO PS, BORDIGNON SAL, RECH SB, VON POSER GL. (2010) Phenolic compounds in *Hypericum* species from the *Trigynobrathys* section. **Biochemical Systematics and Ecology**. 38(2): 224-228
63. OVERMIER JB, SELIGMAN ME. (1967) Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. **Journal of Comparative & Physiological Psychology**. 63(1): 28-33
64. PAL SINGH I, BHARATE SB. (2006) Phloroglucinol compounds of natural origin. **Natural Product Reports**. 23(4): 558-591
65. PARKER WL, JOHNSON F. (1968) The structure determination of antibiotic compounds from *Hypericum uliginosum*. **Journal of the American Chemical Society**. 90(17): 4716-4723
66. PERAZZO FF, LIMA LM, ROCHA LM, FRANÇA HS, CARVALHO JCT. (2008) Antidepressant activity evaluation of *Hypericum brasiliense* standardized extract. **Pharmacognosy Magazine**. 4(15): 155-158
67. PLETSCHER A. (1991) The discovery of antidepressants: a winding path. **Experientia**. 47(1): 4-8
68. PORSOLT RD, LEPICHON M, JALFRE M. (1977a) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**. 266(5604): 730-732
69. PORSOLT RD, BERTIN A, JALFRE M. (1977b) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**. 229(2): 327-336
70. PORSOLT RD, ANTON G, BLAVET N, JALFRE M. (1978a) Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**. 47(4): 379-391
71. PORSOLT RD, BERTIN A, JALFRE M. (1978b) "Behavioral despair" in rats and mice: strain differences and the effect of imipramine. **European Journal of Pharmacology**. 51(3): 291-294
72. RAMÍREZ I, AMARO JM, BAHSAS A. (2004) Aislamiento e identificación de xantonas de las hojas del *Hypericum laricifolium* Juss. (Guttiferae). Poster presented at the 13th Italian-Latin American Congress on Ethnomedicine, Rome, Italy, 22–25 September 2004
73. ROBSON NKB. (1977) Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 1. Infrageneric classification. **Bulletin of the British Museum-Natural History (Botany)** 5: 291-355

74. ROBSON NKB. (1981) Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 2. Characteristics of the genus. **Bulletin of the British Museum-Natural History (Botany)** 8: 55–226
75. ROBSON NKB. (1987) Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 7. Section 29. *Brathys* (Part 1). **Bulletin of the British Museum-Natural History (Botany)** 16: 1-106
76. ROBSON NKB. (1990): Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 8. Sections 29. *Brathys* (Part 2) and 30 *Trigynobrathys*. **Bulletin of the British Museum-Natural History (Botany)** 20: 1-151
77. ROCHA L, MARSTON A, KAPLAN MAC, STOECKLI-EVANS H, THULL U, TESTA B, HOSTETTMANN K. (1994) An antifungal  $\gamma$ -pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**. 36(6): 1381-1385
78. ROCHA L, MARSTON A, POTTERAT O, KAPLAN AC, STOECKLI-EVANS H, HOSTETTMANN K. (1995) Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**. 40(5): 1447-1452
79. ROCHA L, MARSTON A, POTTERAT O, KAPLAN AC, HOSTETTMANN K. (1996) More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**. 42(1): 185-188
80. ROUX S, SABLÉ E, PORSOLT R D. (2002) Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agent and its effects on behavior and physiological function. **Current Protocols in Pharmacology**. Chapter 10.10. wiley-Interscience.
81. SÁNCHEZ-MATEO CC, PRADO B, RABANAL RM. (2002) Antidepressant effects of the methanol extract of several *Hypericum* species from the Canary Islands. **Journal of Ethnopharmacology**. 79(1): 119-127
82. SÁNCHEZ-MATEO CC, BONKANKA CX, PRADO B, RABANAL RM. (2005) Antidepressant properties of some *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum* Ait. extracts in the forced swimming test in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. 97(3): 541-547
83. SÁNCHEZ-MATEO CC, BONKANKA CX, PRADO B, RABANAL RM. (2007) Antidepressant activity of some *Hypericum reflexum* L. fil. extracts in the forced swimming test in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. 112(1): 115-121
84. SÁNCHEZ-MATEO CC, BONKANKA CX, RABANAL RM. (2009) *Hypericum grandifolium* Choisy: a species native to Macaronesian Region with antidepressant effect. **Journal of Ethnopharmacology**. 121(2): 297-303

85. **SCHULZ V, JOHNE A.** Side effects and drug interactions. In: Müller WE Editor. St. John's Wort and its Active Principles in Depression and Anxiety. Switzerland: Birkhäuser Verlag; 2005: 145-160
86. **SELIGMAN ME, MAIER SF. (1967)** Failure to escape traumatic shock. **Journal of Experimental Psychology.** 74(1): 1-9
87. **SELIGMAN ME. (1972)** Learned Helplessness. **Annual Review of Medicine.** 23(1): 407-412
88. **SOELBERG J, JØRGENSEN LB, JÄGER AK. (2007)** Hyperforin accumulates in the translucent glands of *Hypericum perforatum*. **Annals of Botany.** 99(6): 1097-1100
89. **STEIN AC, CENTURIAO FB, HAAS JS, VIANA AF, DO REGO JC, VON POSER GL, RATES SMK. (2010)** *Hypericum polyanthemum* and its main phloroglucinol derivative Uliginosin B present synergistic effect with different antidepressant drugs in the forced swimming test in mice. Resumo de Pôster, II Encontro do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmaceuticas UFRGS. **Caderno de Farmácia.** 26(suplemento1): 167
90. **SUZUKI O, KATSUMATA Y, OYA M, BLADT S, WAGNER H. (1984)** Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. **Planta Medica.** 50(3): 272-274
91. **TAYLOR HL, BROOKER RM. (1969)** The isolation of uliginosin A and uliginosin B from *Hypericum uliginosum*. **Lloydia.** 32(2): 217-219
92. **VIANA AF. (2002)** Estudo da atividade psicofarmacológica de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul e toxicidade de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schledt [Resumo de Tese de Mestrado]. **Caderno de Farmácia.** 18(1): 40-41
93. **VIANA A, REGO JC, VON POSER GL, FERRAZ A, HECKLER AP, COSTENTIN J, RATES SMK. (2005)** The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. **Neuropharmacology.** 49 (7): 1042-1052
94. **VIANA A, REGO JC, MURANI L, DOURMAP N, HECKLER AP, COSTA TD, VON POSER GL, COSTENTIN J, RATES SMK. (2006)** *Hypericum caprifoliatum* (Guttiferae) Cham & Schlecht.: a species native to south Brazil with antidepressant-like activity. **Fundamental & Clinical Pharmacology.** 20(6): 507-514
95. **VOLLMER J, ROSENSON J. (2004)** Chemistry of St John's wort: Hypericin and hyperforin. **Journal of Chemical Education.** 81(10): 1450-1456

96. **WAGNER H, BLAT S.** Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas, 2<sup>nd</sup> Edition. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1996: 53-71
97. **WAGNER H, BLAT S.** (1994) Pharmaceutical quality of *Hypericum* extracts. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology.** 7(Supplement 1): S65-S68
98. **WANG D, BAI J, SUN F, YANG D.** (2010) Chemical constituents and antidepressant activity of the new species *Hypericum enshiense* occurring in china. **Phytomedicine.** 17(6): 410-413
99. **WONNEMANN M, SINGER A, SIEBERT B, MÜLLER WE.** (2001) Evaluation of synaptosomal uptake inhibition of most relevant constituents of St. John's wort. **Pharmacopsychiatry.** 34(Supplement1): 148-151
100. **WONG ML, AND LICINIO J.** (2001) Research and treatment approaches to depression. **Nature Review Neuroscience.** 2(5): 343-351
101. **YAMAKI M, MIWA M, ISHIGURO K, TAKAGI S.** (1994) Antimicrobial activity of naturally occurring and synthetic phloroglucinols against *Staphylococcus aureus*. **Phytoterapy Research.** 8(2): 112-114
102. **YAMANAKA S, HASHIMOTO M, TOBE M, KOBAYASHI K, SEKIZAWA J, NISHIMURA M.** (1990) A simple method for screening assessment of acute toxicity of chemicals. **Archives of Toxicology.** 64(4): 262-268
103. **ZANOLI P, RIVASI M, BARALDI C, BARALDI M.** (2002) Pharmacological activity of hyperforin acetate in rats. **Behavioural Pharmacology.** 13(8): 645-561
104. **ZOBAYED SMA, AFREEN F, GOTO E, KOZAI T.** (2006) Plant-environment interactions: Accumulation of hypericin in dark glands of *Hypericum perforatum*. **Annals of Botany.** 98(4): 793-804

# **ANEXOS**

**ANEXO 1. PERMISO DE COLECCIÓN DE LAS ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO  
EMITIDO POR LA DIRECCIÓN GENERAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE.**

ICO

Fotocopia es auténtica y Exactamente igual  
original que he tenido a la vista y con el cual  
cada.

Lima ..... 09 ABR. 2010

MARIA DEL PILAR TUPIA VILLAGORTA  
REDAJARIA SUPLENTE  
R.M. N° 0541-2009-AG



**RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0147-2010-AG-DGFFS-DGEFFS**

Lima, 09 ABR. 2010

**VISTA:**

La solicitud de Autorización para realizar investigación científica fuera de Áreas Naturales Protegidas con colecta de flora y/o fauna silvestre por el período de hasta un año presentada por el Señor Gary Vidal Ccana Ccpatinta, identificado con DNI N° 44665911, ante la ATFFS Cusco el pasado 14 de enero de 2010, la cual la remitió a esta Dirección General Forestal y de Fauna Silvestre mediante Oficio N° 049-2010-AG-DGFFS-ATFFS-CUSCO, el cual fue ingresado con código único de trámite N° 4849 el 26 de enero de 2010; y,

**CONSIDERANDO:**

Que, mediante el documento de la vista, el Señor Gary Vidal Ccana Ccpatinta, tesista nacional de la Universidad Nacional de San Antonio de Abad del Cusco, solicitó autorización de investigación para desarrollar el proyecto "Determinación de la actividad antidepresiva en la prueba de nado forzado en ratas Sprague-Dawley y de la toxicidad aguda en ratones Balb-C53, de los extractos metanólicos de las partes aéreas en floración de las especies del género *Hypericum* de la Región Cusco"; fuera de Áreas Naturales Protegidas en el Centro Poblado de Amparaes del distrito y provincia de Calca, en el Sector de Pumahuanca-Pacchacc del distrito y provincia de Urubamba, en el Sector de Challabamba alta del distrito de Challabamba de la provincia de Paucartambo y el Centro poblado Kiteni del distrito de Echarati de la provincia de La Convención, del departamento de Cusco; por el período de un año;

Que, el Decreto Supremo N° 014-2001-AG, Reglamento de la Ley Forestal y de Fauna Silvestre, establece en el artículo 328° que la investigación científica o estudio que implique colección de especímenes o elementos de la flora y fauna silvestre no vedados y la obtención de datos e información de campo, requiere autorización del INRENA;

Que, la tercera disposición final del D.S. N° 003-2009-MINAM, que eleva a rango de Decreto Supremo a la R.M. N° 087-2008-MINAM y ratifica la aprobación del Reglamento de Acceso a los Recursos Genéticos, indica que la obtención de permisos, autorizaciones y demás documentos que otorguen entidades públicas, tales como el MINAG y que amparen la investigación, obtención, provisión, transferencia u otro de recursos biológicos, con fines distintos a su utilización como fuente de recursos genéticos, no faculta a sus titulares a utilizar dichos recursos como medio para acceder a los recursos genéticos, ni determinan ni presumen autorización de acceso;

Que, la Resolución Ministerial N° 698-2007-AG que aprueba la publicación del Texto Único de Procedimientos Administrativos (TUPA) del ex Instituto Nacional de Recursos Naturales - INRENA, establece en su numeral 65, los requisitos para la Autorización para realizar extracción de flora y/o fauna silvestre con fines de investigación científica;

Que, en aplicación del último párrafo del artículo 6° de la Resolución Ministerial N° 084-2007-PCM, resulta aplicable el Texto Único de Procedimientos Administrativos a que se hace referencia en el considerando precedente, en tanto el Ministerio de Agricultura culmine con la actualización de su propio Texto Único de Procedimientos Administrativos;

Que, el Informe N° 1071-2010-AG-DGFFS-DGEFFS del 06 de abril del presente año de la Dirección de Gestión Forestal y de Fauna Silvestre concluye que el estudio permitirá evaluar la potencial actividad antidepresiva, desde un punto de vista químico-taxonómico, de los extractos



metanólicos de las partes aéreas en floración del *Hypericum silenoides*, *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum struthiolifolium* e *Hypericum strictum*, especies espontáneas de la región del Cusco;

Que, el mismo Informe señala que, dados los objetivos propuestos en el estudio, se considera procedente autorizar la colecta de partes aéreas en floración de *Hypericum silenoides*, *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum struthiolifolium* y *Hypericum strictum* (Familia Hypericaceae); y,

En uso de las atribuciones conferidas por el artículo 61° del Decreto Supremo N° 031-2008-AG, que aprueba el Reglamento de Organización y Funciones del Ministerio de Agricultura; que en su inciso n) precisa como funciones de la Dirección de Gestión Forestal y de Fauna Silvestre la de autorizar la extracción de especímenes de flora, fauna silvestres y microorganismos con fines de investigación.

#### SE RESUELVE:

**Artículo 1°.-** Autorizar al Señor Gary Vidal Ccana Ccpatinta la investigación científica y la colecta de partes aéreas en floración de *Hypericum silenoides*, *Hypericum andinum*, *Hypericum brevistylum*, *Hypericum struthiolifolium* y *Hypericum strictum* (Familia Hypericaceae), fuera de Áreas Naturales Protegidas en el Centro Poblado de Amparaes del distrito y provincia de Calca, en el Sector de Pumahuanca-Pacchacc del distrito y provincia de Urubamba, en el Sector de Challabamba alta del distrito de Challabamba de la provincia de Paucartambo y el Centro poblado Kiteni del distrito de Echarati de la provincia de La Convención, del departamento de Cusco, como parte del proyecto "Determinación de la actividad antidepresiva en la prueba de nado forzado en ratas Sprague-Dawley y de la toxicidad aguda en ratones Balb-C53, de los extractos metanolicos de las partes aéreas en floración de las especies del género *Hypericum* de la Región Cusco", por el período de hasta un (01) año a partir de la emisión de la presente Resolución Directoral.

**Artículo 2°.-** El titular de la autorización y los investigadores que intervengan en la implementación de la presente autorización, se compromete a:

- a) Colectar únicamente los especímenes autorizados.
- b) No ceder el material colectado a terceros.
- c) Si por razones científicas acotadas, se requiere enviar al extranjero parte del material colectado, los interesados deberán gestionar el correspondiente Permiso de Exportación ante la Dirección General Forestal y de Fauna Silvestre, así como pasar el control respectivo.
- d) Entregar el 50% del material colectado por especie y tipo de muestra a una institución científica nacional debidamente reconocida. Los ejemplares únicos de los grupos taxonómicos colectados y holotipos, sólo podrán ser exportados en calidad de préstamo.
- e) No contactar, ni ingresar a los territorios comunales o privados sin contar con la autorización de las autoridades comunales o privados correspondientes.
- f) Entregar a la Dirección General Forestal y de Fauna Silvestre tres (03) copias del informe final en idioma español, como resultado de la autorización otorgada, copias del material fotográfico y/o slídes que puedan ser utilizadas para difusión. Así mismo entregar seis (06) copias de las publicaciones, producto de la investigación realizada en formato impreso y digital, que incluya la lista taxonómica de las especies de fauna y flora objeto de la presente autorización de colecta con las respectivas coordenadas (en formato excel).
- g) Indicar el número de la Resolución en las publicaciones generadas a partir de la autorización concedida.

**Artículo 3°.-** La Dirección de Gestión Forestal y de Fauna Silvestre no se responsabiliza por accidentes o daños sufridos por el solicitante de esta autorización, durante la ejecución del proyecto; asimismo, se reserva el derecho de demandar del proyecto de investigación los



cambios a que hubiese lugar en los casos en que se dicten nuevas disposiciones legales o se formulen ajustes sobre la presente autorización.

**Artículo 4°.-** Los derechos otorgados sobre los recursos biológicos no otorgan derechos sobre los recursos genéticos contenidos en ellos, ni autoriza el estudio a nivel genético, de acuerdo con la tercera disposición final del D.S. N° 003-2009-MINAM, que eleva a rango de Decreto Supremo a la R.M. N° 087-2008-MINAM y ratifica la aprobación del Reglamento de Acceso a los Recursos Genéticos.

**Artículo 5°.-** El incumplimiento de los compromisos adquiridos será causal para denegar futuras autorizaciones a nivel institucional.

**Artículo 6°.-** Notificar la presente Resolución Directoral al Señor Gary Vidal Ccana Ccapatinta, y transcribirla a la Dirección de Información y Control Forestal y de Fauna Silvestre, a las Administración Técnica Forestal y de Fauna Silvestre Cusco.

Regístrese y comuníquese



Ing. Nélida Barbagelata Ramírez  
Directora de Gestión Forestal y de Fauna Silvestre (e)

**ANEXO 2. CERTIFICADO SANITARIO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN  
EMITIDO POR EL BIOTERIO DEL INS.**



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD  
CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS  
COORDINACIÓN DE BIOTERIO

**CERTIFICADO SANITARIO N°** 089-2010

Producto	: Ratón albino	Lote N°	: M - 15 - 2010
Especie	: <u>Mus musculus</u>	Cantidad	: 300
Cepa	: Balb/c/CNPB	Edad	: 21 a 23 días
Peso	: 11 a 14 gr.	Sexo	: Machos
B.V- N°	: 004-12369 G.R. 021182	Destino	: Ccana Ccapatinta, Gari Vidal Univ. San Antonio Abad - Cuzco
Fecha	: 09-04-10		

El Médico Veterinario, que suscribe, **Arturo Rosales Fernández**, Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias \*.

\*Referencia: PR.T-CNPB-153. Procedimiento para el Ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación

Chonillos, 09 de Abril del 2010

  
.....  
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 3. DISEÑO METODOLÓGICO DE DETERMINACIÓN DE LA DL<sub>50</sub> POR EL MÉTODO DE LORKE.

#### Diseño con post prueba únicamente:

SIMBOLOGÍA:        G = Grupo  
                              X = Estímulo  
                              O = Medición

FASE I: Los tres grupos de la pre-prueba fueron formados por tres animales de experimentación según la Tabla N°3 del método de Lorke.

G <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	O <sub>1</sub> O <sub>4</sub> O <sub>7</sub> O <sub>10</sub> O <sub>13</sub> O <sub>16</sub> O <sub>19</sub> O <sub>22</sub> O <sub>25</sub>
G <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> O <sub>5</sub> O <sub>8</sub> O <sub>11</sub> O <sub>14</sub> O <sub>17</sub> O <sub>20</sub> O <sub>23</sub> O <sub>26</sub>
G <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>3</sub> O <sub>6</sub> O <sub>9</sub> O <sub>12</sub> O <sub>15</sub> O <sub>18</sub> O <sub>21</sub> O <sub>24</sub> O <sub>27</sub>

Donde:

G<sub>1</sub>...G<sub>3</sub>= Grupos experimentales formados por tres individuos.

X<sub>1</sub> = Dosis de 10 mg/kg de extracto seco.

X<sub>2</sub> = Dosis de 100 mg/kg de extracto seco.

X<sub>3</sub> = Dosis de 1000 mg/kg de extracto seco.

O<sub>1</sub>...<sub>3</sub> = Observación de efectos tóxicos agudos o muerte a los cinco minutos.

O<sub>4</sub>...<sub>6</sub> = Observación de efectos tóxicos agudos o muerte a los diez minutos.

O<sub>7</sub>...<sub>9</sub> = Observación de efectos tóxicos agudos o muerte a los quince minutos.

O<sub>10</sub>...<sub>12</sub> = Observación de efectos tóxicos agudos o muerte a los veinte minutos.

O<sub>13</sub>...<sub>15</sub> = Observación de efectos tóxicos agudos o muerte a los treinta minutos.

O<sub>16</sub>...<sub>18</sub> = Observación de efectos tóxicos agudos o muerte a los sesenta minutos.

O<sub>19</sub>...<sub>21</sub> = Observación de efectos tóxicos agudos o muerte a los ciento veinte minutos.

O<sub>22</sub>...<sub>24</sub> = Observación de efectos tóxicos agudos o muerte a las seis horas.

O<sub>25</sub>...<sub>27</sub> = Observación de efectos tóxicos agudos o muerte a las veinticuatro horas.

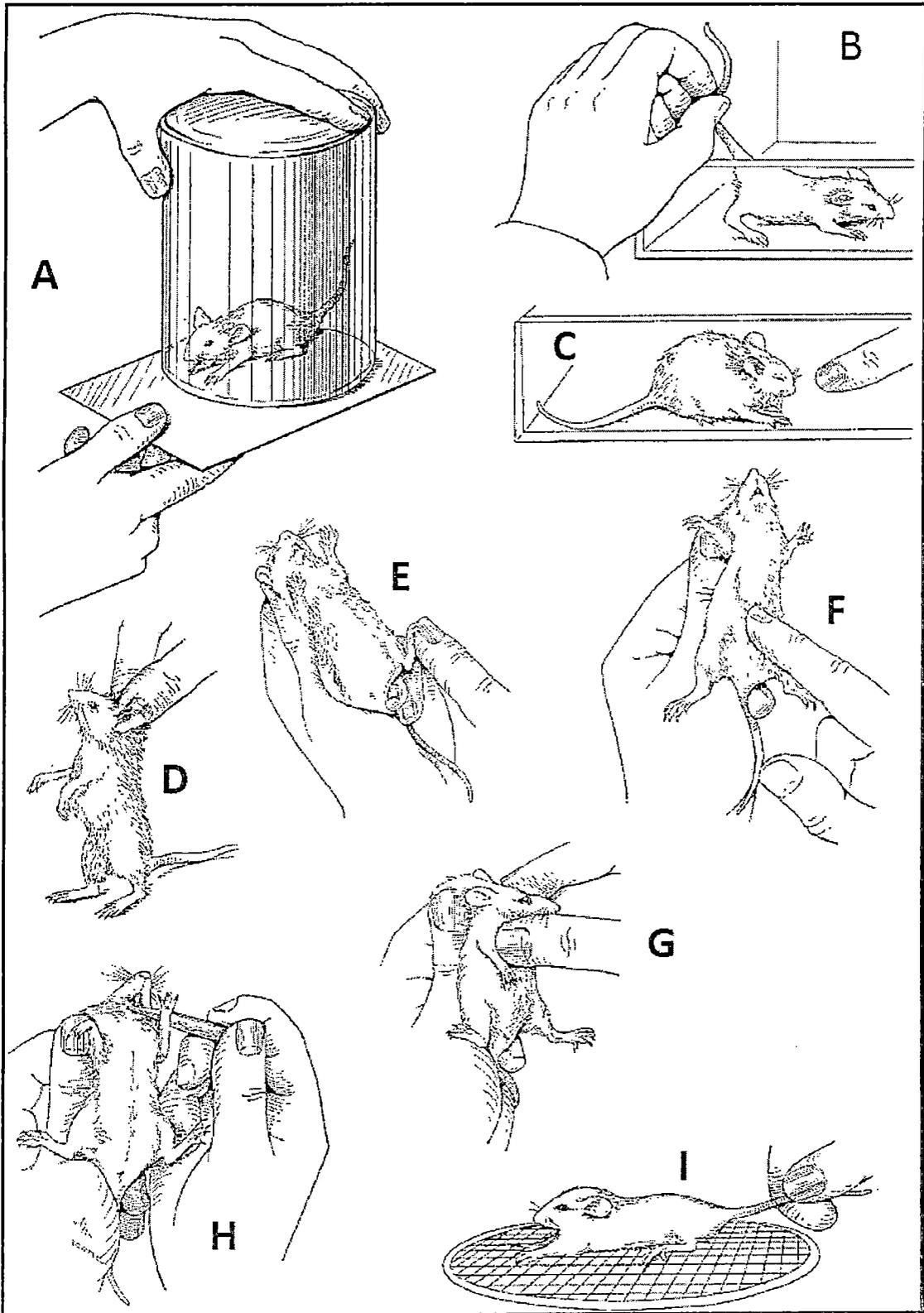
FASE II: los grupos de la segunda prueba estarán formados por un único animal de experimentación. Las dosis, el número de grupos y de observaciones se determinaran con ayuda de la Tabla N°3 y estarán en función a los resultados de primera fase.

**ANEXO 4. HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LAS MEDICIONES FISIOLÓGICAS Y CONDUCTUALES ENSAYADAS EN EL TEST DE IRWIN.**

Dosis (mg/kg)														
Peso														
Tiempo min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	60 min	120 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	60 min	120 min
Letalidad														
Convulsiones														
Temblores														
Cola de Straub														
Sedación	#													
	#													
	#													
Excitación	#													
	#													
	#													
Marcha anormal														
Salto														
Pérdida del equilibrio														
Incoordinación motora														
Retorcimientos														
Piloerección														
Estereotipias														
Contracciones de cabeza														
Conducta de rascarse														
Tasa de respiración														
Agresividad														
Miedo														
Reactividad al tacto														
Tono muscular														
Reflejo. enderezamiento														
Ptosis														
Exoftalmos														
Pérdida de aprehensión														
Acinesia														
Catalepsia														
Pérdida de tracción														
Pérdida del Reflejo corneal														
Analgesia														
Defecación														
salivación														
Lagrimeo														
Hipotermia														
Hipertermia														
Miosis														
Midriasis														

FUENTE: Modificado de ROUX *et al.*, 2003.

**FIGURA N°32.** representación de algunas mediciones fisiológica y conductuales ensayadas en el test de Irwin: A, observación inicial; B, Transporte a la arena; C, reactividad al tacto; D, catalepsia; E, observación de la piel de miembros inferiores y superiores; F, observación del tono muscular abdominal; G, observación de lagrimeo; H, observación de la salivación; I, fuerza de aprehensión.



FUENTE: Modificado de IRWIN, 1968.

**ANEXO 5. MEDICIONES FISIOLÓGICAS Y CONDUCTUALES EVALUADAS EN EL TEST DE IRWIN (Modificado de ROUX *et al.*, 2003.).**

<b>SIGNOS</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
<b>LETALIDAD</b>	Presencia (+)
<b>CONVULSIONES</b>	Presencia (+)
<b>TEMBLORES</b>	Presencia (+): todo el cuerpo del animal tiembla.
<b>COLA DE STRAUB</b>	Presencia (+): la cola adquiere forma de arco en posición vertical.
<b>SEDACIÓN</b>	Presencia (+), con 3 intensidades: intensidad 1: después de quitar la tapa de la jaula y de manipulación, los animales se mueven más lentamente que el control; intensidad 2: en las mismas condiciones, los animales se mueven muy lentamente; intensidad 3: en las mismas condiciones, los animales no se mueven.
<b>EXCITACIÓN</b>	Presencia (+), con 3 intensidades: intensidad 1: después de quitar la tapa de la jaula y de manipulación, los animales son un poco más activo que el control; intensidad 2: en las mismas condiciones, los animales se mueven rápidamente (con pausas); intensidad 3: en las mismas condiciones, los animales se mueven muy rápidamente (Sin pausas).
<b>MARCHA ANORMAL</b>	Presencia (+)
<b>SALTOS</b>	Presencia (+)
<b>PÉRDIDA DEL EQUILIBRIO</b>	Presencia (+): los animales caen de costado al caminar.
<b>INCOORDINACIÓN MOTORA</b>	Presencia (+): locomoción desorganizada.
<b>RETORCIMIENTO</b>	Presencia (+): estiramiento de las extremidades traseras, con los flancos huecos (visualmente aparentes movimientos abdominales).
<b>PILOERECCIÓN</b>	Presencia (+)
<b>ESTEREOTIPIAS</b>	Presencia (+): movimientos repetidos anormales en comparación con el control (indicar si el animal se dedica a oler, masticar o a realizar movimientos de la cabeza).
<b>CONTRACCIONES DE CABEZA</b>	Presencia (+): sacudidas súbita (sacádicos) de la cabeza.
<b>CONDUCTA DE RASCARSE</b>	Presencia(+): rascado con patas traseras o delanteras de cualquier parte del cuerpo.
<b>TASA DE RESPIRACIÓN</b>	Incremento (+) o disminución (-): La tasa de respiración es comparada con el grupo control. Esta es solo una observación subjetiva y es únicamente anotada cuando es claramente observada ( <b>fig. A</b> ).
<b>AGRESIVIDAD</b>	Presencia (+): morder en respuesta a un golpe suave hacia la cabeza con la pluma un bolígrafo

<b>MIEDO</b>	Incremento (+) o disminución (-): se realiza un “snap” por encima de la jaula: la reacción del animal (retroceso, saltos, etc.) se compara con el control ( <b>fig. C</b> ).
<b>REACTIVIDAD AL TACTO</b>	Incremento (+) o disminución (-): la reacción de escape de los a la presión con los dedos sobre las patas traseras se compara con el control
<b>TONO MUSCULAR</b>	Incremento (+) o disminución (-): La dureza o la suavidad de las paredes del estómago cuando se presiona lateralmente entre dedo índice y el pulgar ( <b>fig. D</b> ).
<b>PÉRDIDA DEL REFLEJO DE ENDEREZAMIENTO</b>	Presencia (+): incapacidad del animal a erguirse sí mismo después de su puesta de espaldas ( <b>fig. H</b> ).
<b>PTOSIS</b>	Presencia (+): párpados parcial o totalmente cerrados
<b>EXOFTALMOS</b>	Presencia (+): protrusión de los globos oculares
<b>PÉRDIDA DE LA FUERZA DE APREHENSIÓN</b>	Presencia (+): puesto en una malla de alambre horizontal, los animales no pueden mantenerse sobre ella cuando son rápidamente arrastrado por la cola ( <b>fig. F, G</b> ).
<b>ACINESIA</b>	Presencia (+): situado en la cabeza una malla de alambre (un ángulo de aproximadamente 30° respecto a la horizontal), el animal no se mueven de forma espontánea.
<b>CATALEPSIA</b>	Presencia (+): colocado una postura erguida sobre sus patas traseras (posición de Buda), el animal no se mueve ( <b>fig. E</b> ).
<b>PÉRDIDA DE TRACCIÓN</b>	Presencia (+): el animal suspendido en una barra horizontal por las patas delanteras no poner sus patas traseras sobre la barra en un plazo de 5 seg., se repite por 3 veces para estar seguro.
<b>PÉRDIDA DEL REFLEJO CORNEAL</b>	Presencia (+): los animales no se cierra completamente los ojos cuando se les toca con un bolígrafo en los ojos ( <b>fig. I</b> ).
<b>ANALGESIA</b>	Presencia (+): el animal no reacciona (por ejemplo, orientándose hacia las pinzas, vocalización) cuando se pellizca en la base de la cola con pinzas.
<b>DEFECACIÓN</b>	Presencia (+)
<b>SALIVACIÓN</b>	Presencia (+): humedad visible alrededor de la boca.
<b>LAGRIMEO</b>	Presencia (+): humedad visible alrededor de los ojos.
<b>HIPOTERMIA</b>	Presencia (+), con 3 niveles basados en la temperatura media medida en los animales tratados y de control: intensidad 1: disminución > 1°C; intensidad 2: disminución de 2°C; intensidad 3: disminución > 3°C.
<b>HIPERTERMIA</b>	Presencia (+), con 3 niveles basados en la temperatura media medida en los animales tratados y de control: intensidad 1: aumento > 1°C; intensidad 2: aumento de 2°C; intensidad 3: aumento > 3°C.
<b>MIOSIS</b>	Presencia (+)
<b>MIDRIASIS</b>	Presencia (+)

**ANEXO 6. DISEÑO METODOLÓGICOS DE DE LA PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA EN RATONES.**

Curva dosis respuesta de la fluoxetina: Diseño con postprueba únicamente, dosis única y grupo de control:

**SIMBOLOGÍA:**

G = Grupo  
X = Tratamiento  
O = Medición

G <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	O <sub>1</sub>
G <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
G <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>
G <sub>4</sub>	--	O <sub>4</sub>

Donde:

G<sub>1</sub> = Grupo experimental formado por 6 ratones que recibió 20 mg/kg de fluoxetina.

G<sub>2</sub> = Grupo experimental formado por 6 ratones que recibió 30 mg/kg de fluoxetina.

G<sub>3</sub> = Grupo experimental formado por 6 ratones que recibió 40 mg/kg de fluoxetina.

G<sub>4</sub> = Grupo experimental formado por 6 ratones que recibió el vehículo.

X<sub>1</sub> = Dosis de fluoxetina a 20 mg/kg de peso.

X<sub>2</sub> = Dosis de fluoxetina a 30 mg/kg de peso.

X<sub>3</sub> = Dosis de fluoxetina a 40 mg/kg de peso.

-- = Administración del vehículo.

O<sub>1...O<sub>4</sub></sub> = Mediciones del tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada después de 1 hora de administrado el tratamiento, por un periodo de 4 minutos.

## ANEXO 7. DISEÑO METODOLÓGICOS DE DE LA PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA EN RATONES.

Curva dosis respuesta de los extractos secos etanólicos de las partes aéreas en floración de algunas especies de *Hypericum*: Diseño con postprueba únicamente, dosis única y grupo de control:

### SIMBOLOGÍA:

G = Grupo  
X = Tratamiento  
O = Medición

G <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	O <sub>1</sub>
G <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
G <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>
G <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	O <sub>4</sub>
G <sub>5</sub>	X <sub>5</sub>	O <sub>5</sub>
G <sub>6</sub>	--	O <sub>6</sub>

Donde:

- G<sub>1</sub> = Grupo experimental formado por 10 ratones que recibió 125 mg/kg de extracto.  
G<sub>2</sub> = Grupo experimental formado por 10 ratones que recibió 250 mg/kg de extracto.  
G<sub>3</sub> = Grupo experimental formado por 10 ratones que recibió 500 mg/kg de extracto.  
G<sub>4</sub> = Grupo experimental formado por 10 ratones que recibió 1000 mg/kg de extracto.  
G<sub>5</sub> = Grupo experimental formado por 10 ratones que recibió 30 mg/kg de fluoxetina.  
G<sub>6</sub> = Grupo experimental formado por 10 ratones que recibió el vehículo.  
X<sub>1</sub> = Dosis de extracto de *Hypericum* de 125 mg/kg.  
X<sub>2</sub> = Dosis de extracto de *Hypericum* de 250 mg/kg.  
X<sub>3</sub> = Dosis de extracto de *Hypericum* de 500 mg/kg.  
X<sub>4</sub> = Dosis de extracto de *Hypericum* de 1000 mg/kg.  
X<sub>5</sub> = Dosis de fluoxetina a 30 mg/kg.  
-- = Administración del vehículo.  
O<sub>1...O6</sub> = Mediciones del tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada después de 1 hora de administrado el tratamiento, por un periodo de 4 minutos.

**ANEXO 8. HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA MEDICIÓN DEL TIEMPO DE INMOVILIDAD EN LA PRUEBA DE NATACIÓN FORZADA.**

Un ratón es juzgado como inmóvil cuando cesan todos los comportamientos activos y se mantiene pasivo flotante o realizaba movimientos mínimos necesarios para mantener la nariz fuera del agua. Para la medicación del tiempo de inmovilidad total durante los últimos cuatro minutos de la PNF 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: **Inmovilidad: I**

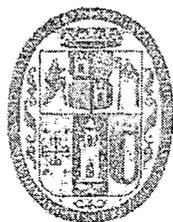
**Comportamientos activos** (lucha, natación y saltos): X

Grupo:	Numero:		Cogido de videograbación:						Color:			
MINUTO	SEGUNDOS											
Min1	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Min2	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Min3	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Min4	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Min5	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Min6	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Tiempo de inmovilidad en los cuatro últimos minutos:												

Grupo:	Numero:		Cogido de videograbación:						Color:			
MINUTO	SEGUNDOS											
Min1	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Min2	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Min3	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Min4	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Min5	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Min6	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-60
Tiempo de inmovilidad en los cuatro últimos minutos:												

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

## ANEXO 9. IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO  
ABAD DEL CUSCO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

QUIEN SUSCRIBE:

### CERTIFICA

Que el Bachiller Gari Vidal Ccana Ccapatinta de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas, Farmacia e informática de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, ha presentado al Herbario Vargas (CUZ) cuatro muestras botánicas herborizadas para su determinación.

Dicho material ha sido sometido a una diagnosis en base a claves taxonómicas, análisis morfológico, filogenético y comparación con muestras existentes en el herbario siguiendo su posición taxonómica de acuerdo al sistema de clasificación de Arthur Cronquist (1981):

Reino: Plantae  
División: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida  
Orden: Malpighiales  
Familia: Hypericaceae  
Subfamilia: Hypericoideae  
Tribu: Hypericeae  
Género: *Hypericum* L.

Y siguiendo la clasificación filogenética de las angiospermas según el APG II (2003):

Reino: Plantae  
Clado: Angiosperms  
Clado: Eudicots  
Clado: Core eudicots  
Clado: Rosids  
Clado: Eurosids I  
Orden: Malpighiales  
Familia: Hypericaceae  
Género: *Hypericum*  
Sección: H. secc. *Brathys*  
H. secc. *Trigynobrathys*

En base a dichos análisis se han identificado las siguientes especies:

**H. secc. *Brathys*:**

*Hypericum andinum* Gleason. (Muestra GVCC 06)

*Hypericum laricifolium* Juss. (Muestra GVCC 08)

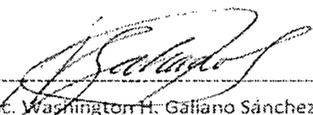
**H. secc. *Trigynobrathys*:**

*Hypericum brevistylum* Choisy. (Muestra GVCC 04)

*Hypericum silenoides* Juss. (Muestra GVCC 02)

Se le expide la presente certificación de determinación de las especies para los fines que el interesado viera por conveniente.

Cusco, 11 de Febrero del 2011



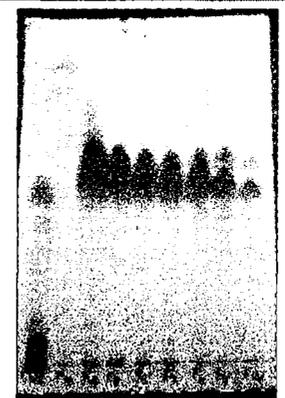
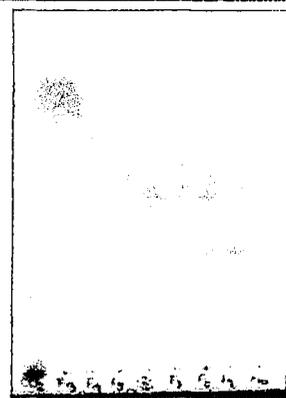
M. Sc. Washington H. Galiano Sánchez  
Profesor principal del Departamento Académico de Biología.  
Investigador asociado al Herbario Vargas (CUZ) - UNSAAC.

**ANEXO 10. RESUMEN FOTOGRÁFICO.**

**Especies incluidas en el presente estudio:**

<i>H. andinum</i>	<i>H. brevistylum</i>	<i>H. laricifolium</i>	<i>H. silenoides</i>
			

**Estudio fitoquímico:**

Cromatografía en columna	Cromatografía en capa fina	Placa cromatográfica en luz UV 256nm	Placa revelada con anisaldehído sulfúrico
			

**Prueba de natación forzada:**

Aparato para la prueba de natación forzada	Postura de movimiento	Postura de inmovilidad
		

## Behavioural Despair in Mice: A Primary Screening Test for Antidepressants

R. D. PORSOLT, A. BERTIN AND M. JALFRE

*Unité de Neuropharmacologie, Centre de Recherche Delalande,  
10 rue des Carrières, 92500 Rueil-Malmaison, France*

---

**Abstract**—A depressed state can be induced in mice by forcing them to swim in a narrow cylinder from which they cannot escape. After a brief period of vigorous activity the mice adopt a characteristic immobile posture which is readily identifiable. Immobility was reduced by tricyclic antidepressants, monoamine oxidase inhibitors and atypical antidepressants, as well as by electroconvulsive shock. Psychostimulants also reduced immobility but in contrast to antidepressants caused marked motor stimulation. Immobility was not affected by minor or major tranquilisers. These findings, closely parallel to those we have previously reported in rats, suggest that the procedure is selectively sensitive to antidepressant treatments. The mouse procedure is, however, more rapid and less costly than that with rats and is thus more suitable for the primary screening of antidepressant drugs.

---

### Introduction

We have recently described a new behavioural method for inducing a depressed state in rats (Porsolt *et al.*, 1977a, b). Rats are forced to swim in a narrow cylinder from which they cannot escape. After an initial period of vigorous escape-directed activity the rats adopt a characteristic immobile posture which is readily identifiable. We suggested that immobility reflected a state of lowered mood in the rat and showed that immobility was selectively reduced by a variety of different antidepressant treatments. Positive findings with several atypical antidepressant drugs such as iprindole, mianserin and viloxazine indicated that the method might be useful in detecting new kinds of antidepressants not readily identified using classical screening tests.

Nevertheless, as a primary screening test, the method we described possesses several disadvantages. Firstly the procedure is lengthy: to produce stable and sufficient immobility, it was necessary to expose the rats for 15 min to the test

situation 24 hr before the 5 min drug test. It is evident that experiments requiring a 24 hr interval between sessions limit the number of compounds which can be tested. Secondly, to obtain statistically reliable pharmacological effects in a small number of animals ( $n = 5$  per dose) it was necessary to give either 2 or 3 drug injections before testing (Porsolt *et al.*, 1977b). All doses therefore had to be selected in advance and not during the course of the experiment which would be preferable for dose finding studies. Finally rats as experimental animals are both more costly than mice and require larger quantities of new test compounds two economic factors which should be taken into account.

In this paper we describe a new version of the procedure which satisfies more closely the requirements of a primary screening test. We show that a state of immobility similar to that observed in rats can be readily induced in mice during a single brief exposure to the test situation. We show further that immobility in the mouse is selectively sensitive to a wide variety of antidepressant treatments after a single administration.

## Methods

### 1. *Experimental animals*

Male CD (Charles River) mice, weighing 20–25 g, were used. They were housed in groups of 10 in macrolon cages ( $21 \times 11 \times 8$  cm) with free access to food and water for at least 24 hr before starting an experiment. All animals within a cage received the same treatment.

### 2. *Apparatus*

The apparatus consisted of 2 plexiglass cylinders (height: 25 cm; diameter: 10 cm) placed side by side in a macrolon cage ( $24 \times 11 \times 8$  cm) containing 6 cm of water at 21–23° C. A non-transparent panel placed between the 2 cylinders prevented the mice from seeing each other (Fig. 1).

### 3. *Test procedure*

Preliminary experiments were conducted to determine the best conditions for obtaining a maximum of immobility in a minimum of time. 15 mice were dropped into the cylinders one at a time and left there for 15 min. The duration of immobility occurring in each minute was scored. A mouse was judged to be immobile when it ceased struggling and remained floating motionless in the water making only those movements necessary to keep its head above water (Fig. 1).

On the basis of these experiments (results, section 1) the following drug testing procedure was adopted: 1 hr after a single i.p. injection mice were

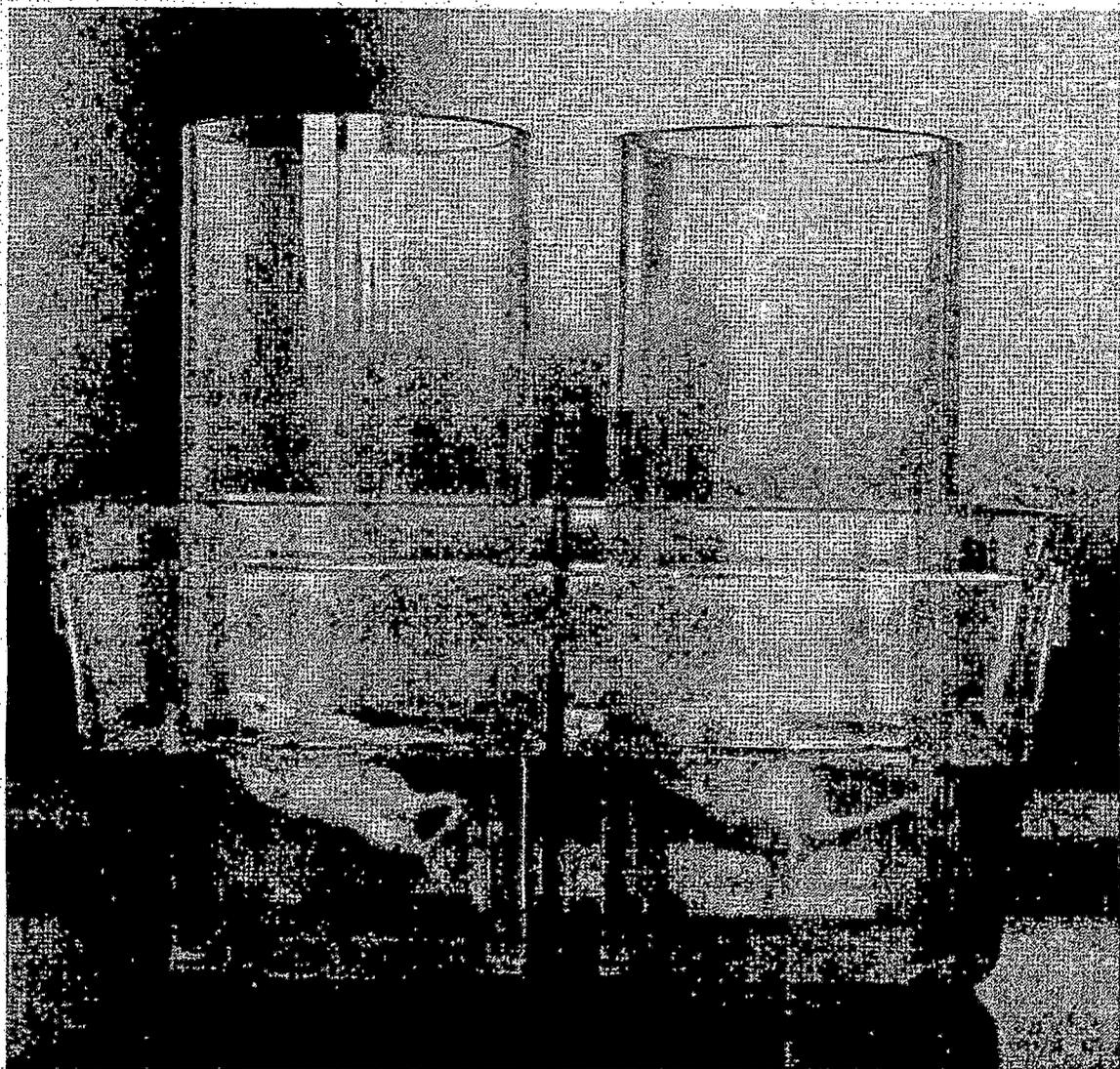


FIG. 1

Two mice showing characteristic postures of immobility after 5 min in the test apparatus.

dropped into the cylinders and left there for 6 min. Because little immobility is observed during the first 2 min, only that occurring during the last 4 min was counted. The first 2 min could thus be used for weighing and injecting further mice thereby reducing the total experimental time. With this procedure mice remained immobile for about 180 sec of the 240 sec measurement period, thus providing a suitable baseline against which to measure the effects of drugs. Two mice were tested simultaneously, both having received the same treatment.

#### 4. *Drugs*

The drugs and doses tested are shown in Table I. They were either dissolved in 0.9 % NaCl or, if insoluble, dispersed in an aqueous suspension of Tween 80.

(0.2 % w/v 0.9 % NaCl). All drugs were injected i.p. in a constant volume of 20 ml/kg 1 hr before testing. The doses are expressed in terms of either the base or the salt as indicated in Table I. Ten mice were tested at each dose.

### 5. *Electroconvulsive shock (ECS)*

Supramaximal ECS (30 V, DC, 1 sec) was delivered via bucco-occipital electrodes 1 hr before testing. Control mice had the electrodes placed but did not receive shock. Twenty mice were tested in the ECS and control groups respectively.

## Results

### 1. *Behaviour without drugs*

Mice when placed into the cylinders for the first time swim vigorously around apparently searching for an exit. After 2 to 3 min their activity subsides being replaced by periods of immobility of increasing duration where the mice remain floating passively in the water in a semi-horizontal position with their heads just above the water (Fig. 1). After the 4th min a virtual plateau is reached, the mice remaining immobile for approximately 85 % of the time (Fig. 2).

### 2. *The effects of drugs on immobility*

All the antidepressant treatments tested reduced immobility (Table I). The classical tricyclic compounds had clearly dose-dependent effects which occurred despite a marked loss of muscle tonus at the highest doses tested. These apparently sedative effects were most pronounced with amitriptyline and nortriptyline. The monoamine oxidase inhibitors (M. A. O. I.) also reduced immobility but with differing side-effects. Somnolence, lowered muscle tonus and reduced spontaneous motor activity in their cages were observed at the highest doses of Lilly 51641, nialamide and toloxatone; in the case of nialamide the sedative effects observed at 300 and 600 mg/kg appeared to mask the reduced immobility observed at 150 mg/kg. With *dl*-deprenyl and tranylcypromine, on the other hand, reductions in immobility were accompanied at the highest doses by signs of excitation (increased spontaneous activity with squeaking and jumping); 20 mg/kg tranylcypromine was already toxic causing sialorrhea and hyperventilation. No side-effects were observed with either pargyline or clorgyline at doses which reduced immobility. The atypical antidepressant viloxazine also reduced immobility without apparent side-effects. The two other atypical antidepressants, iprindole and mianserin, both reduced immobility despite marked sedation at 40 and 80 mg/kg. With mianserin the reduction in immobility at 80 mg/kg was no longer statistically significant; at this dose the mice

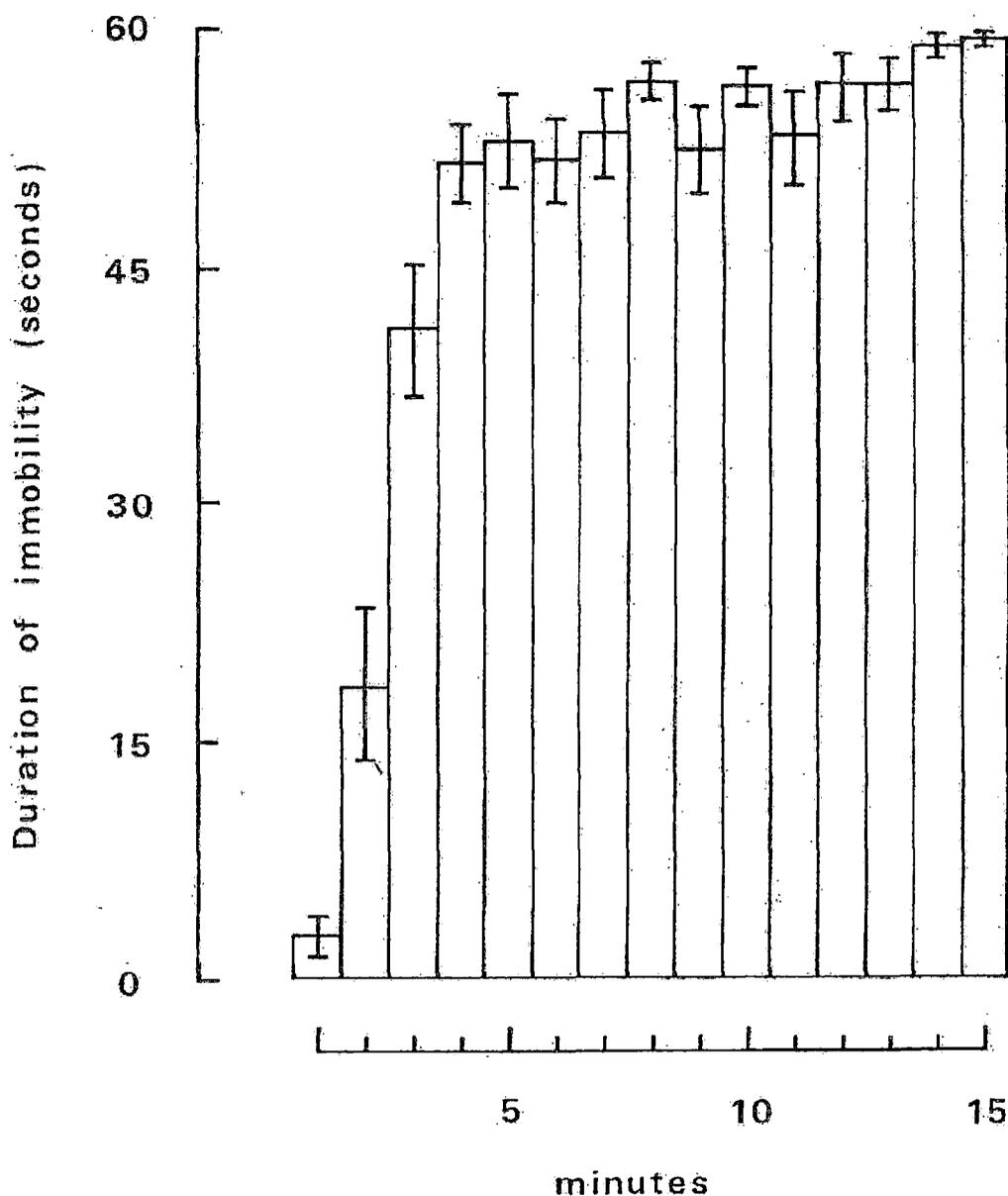


FIG. 2

Mean duration of immobility in mice ( $\pm$  S. E.) as a function of time after being placed in the water for the first time ( $n = 15$ ).

appeared almost incapable of moving and some clonic convulsions were observed. Finally, immobility was reduced by ECS; 20 mice per group were required, however, to produce a statistically significant result.

The two psychostimulants, *d*-amphetamine and caffeine, also reduced immobility but in contrast to the antidepressants this effect appeared due to motor stimulation rather than to persistent attempts to escape; with *d*-amphetamine stereotyped head movements were observed at 5 mg/kg. Neither the minor tranquilisers, chlordiazepoxide and diazepam, nor the major tranquilisers, chlorpromazine and the tetrabenazine-like compound Ro 4-1284 significantly

TABLE I.

Effects of various drugs and ECS on the total duration of immobility in mice during the last 4 min of a 6 min test. Differences from control were assessed statistically using the Dunnett test (2-tailed).

Experimental treatment	Dose (mg/kg i. p.)	Duration of immobility (sec) Mean (S. E.)	% change from control	p (difference from control)
<i>Tricyclic antidepressants</i>				
Amitriptyline HCl	Control	165.5 (25.6)	—	—
	7.5	89.3 (27.2)	- 46	n. s.
	15	59.7 (20.5)	- 64	< .01
	30	45.4 (13.0)	- 73	< .01
Chlorimipramine HCl	Control	175.0 (12.4)	—	—
	5	117.1 (19.3)	- 33	n. s.
	10	112.8 (23.0)	- 36	n. s.
	20	83.7 (23.2)	- 52	< .01
Desimipramine HCl	Control	204.2 (13.9)	—	—
	7.5	128.5 (23.1)	- 37	< .05
	15	65.8 (24.6)	- 68	< .01
	30	61.6 (16.9)	- 70	< .01
Imipramine HCl	Control	189.2 (19.3)	—	—
	7.5	196.2 (8.9)	+ 4	n. s.
	15	153.2 (27.3)	- 19	n. s.
	30	39.5 (19.8)	- 79	< .01
Nortriptyline HCl	Control	197.4 (10.0)	—	—
	15	130.4 (25.0)	- 34	< .05
	30	13.2 (4.3)	- 93	< .01

*Monoamine oxidase inhibitors (M. A. O. I.)*

*Type A*

Clorgyline HCl	Control	135.4 (27.8)	—	—
	15	125.3 (26.1)	- 8	n. s.
	30	96.4 (21.4)	- 29	n. s.
	60	64.6 (20.7)	- 52	< .05
Lilly 51641	Control	223.3 (4.6)	—	—
	10	215.4 (5.9)	- 4	n. s.
	30	181.6 (11.9)	- 19	n. s.
	60	70.2 (23.0)	- 69	< .01
Toloxatone	Control	201.5 (15.7)	—	—
	100	178.6 (13.4)	- 11	n. s.
	200	99.8 (18.6)	- 50	< .01
	400	29.0 (10.2)	- 86	< .01

TABLE I (continued)

Experimental treatment	Dose (mg/kg i. p.)	Duration of immobility (sec) Mean (S. E.)	% change from control	P (difference from control)
<i>M. A. O. I. (continued)</i>				
<i>Type B</i>				
dl-Deprenyl HCl	Control	188.4 (15.0)	—	—
	1.87	84.9 (29.9)	- 55	< .01
	3.75	47.5 (16.9)	- 75	< .01
	7.5	46.2 (15.4)	- 76	< .01
Pargyline HCl	Control	172.4 (19.7)	—	—
	75	106.8 (26.3)	- 38	n. s.
	150	123.7 (28.3)	- 28	n. s.
	300	61.1 (17.2)	- 65	< .01
<i>Mixed</i>				
Tranlycypromine SO <sub>4</sub>	Control	192.6 (16.6)	—	—
	5	116.2 (25.3)	- 40	n. s.
	10	99.3 (24.0)	- 48	< .05
	20	57.6 (22.8)	- 70	< .01
Nialamide HCl	Control	192.2 (6.9)	—	—
	150	138.1 (17.2)	- 28	< .05
	300	167.1 (16.6)	- 13	n. s.
	600	151.9 (15.4)	- 21	n. s.
<i>Atypical antidepressants</i>				
Iprindole HCl	Control	207.3 (9.6)	—	—
	20	131.9 (25.4)	- 36	< .05
	40	94.3 (15.5)	- 54	< .01
	80	81.4 (18.3)	- 61	< .01
Mianserin HCl	Control	190.4 (13.2)	—	—
	20	106.6 (23.6)	- 44	< .01
	40	88.8 (20.4)	- 53	< .01
	80	143.1 (14.4)	- 25	n. s.
Viloxazine HCl	Control	175.6 (28.5)	—	—
	15	103.8 (27.8)	- 41	n. s.
	30	71.7 (26.7)	- 59	< .05
	60	61.0 (24.1)	- 65	< .05
<i>Electroconvulsive Shock (ECS)</i>	Control ECS	143.4 (16.4) 77.2 (16.8)	— - 46	— < .01

TABLE I. (continued)

Experimental treatment	Dose (mg/kg i. p.)	Duration of immobility (sec) Mean (S. E.)	% change from control	p (difference from control)
<i>Psychostimulants</i>				
d-Amphetamine SO <sub>4</sub>	Control	168.3 (23.4)	—	—
	1.25	50.3 (22.9)	- 70	< .01
	2.5	42.1 (19.1)	- 75	< .01
	5	13.9 (7.4)	- 92	< .01
Caffeine	Control	163.7 (21.3)	—	—
	10	118.6 (19.1)	- 28	n. s.
	20	95.6 (21.9)	- 42	n. s.
	40	73.0 (14.8)	- 55	< .01
<i>Minor tranquilisers</i>				
Chlordiazepoxide HCl	Control	195.9 (11.0)	—	—
	5	196.7 (14.0)	0	n. s.
	10	210.2 (7.4)	+ 7	n. s.
	20	212.1 (11.6)	+ 8	n. s.
Diazepam	Control	170.5 (18.2)	—	—
	2.5	210.0 (8.4)	+ 23	n. s.
	5	208.2 (18.8)	+ 22	n. s.
	10	194.9 (14.3)	+ 14	n. s.
<i>Major tranquilisers</i>				
Chlorpromazine HCl	Control	175.0 (13.7)	—	—
	1	177.8 (18.7)	+ 2	n. s.
	2	163.1 (12.6)	- 7	n. s.
	4	138.6 (12.0)	- 20	n. s.
Ro 4-1284	Control	171.3 (14.0)	—	—
	1.5	199.9 (9.0)	+ 17	n. s.
	3	198.9 (9.0)	+ 16	n. s.
	6	203.2 (8.0)	+ 19	n. s.

affected the duration of immobility in doses ranging from those without noticeable behavioural effect to those which were clearly sedative. Ataxia was observed at the highest doses of chlordiazepoxide and diazepam whereas with the highest doses of chlorpromazine and Ro 4-1284 the mice appeared to have difficulty floating upright in the water.

## Discussion

The experiments reported in this paper show that a state of immobility similar to that seen in rats can readily be induced in mice after a short immersion in water. Further results indicated that immobility in mice, like in rats, is selectively reduced by a wide variety of clinically effective antidepressant treatments including ECS but is not affected by either minor or major tranquilisers. Although the psychostimulants *d*-amphetamine and caffeine also reduced immobility, their effects, as in rats, appeared to be due to general stimulation of motor activity rather than to the persisting attempts to escape seen with the antidepressants. These results thus provide striking confirmation of those previously obtained in the rat (Porsolt *et al.*, 1977a, b) and suggest that a state of lowered mood can also be induced in mice by exposing them to an aversive situation from which they cannot escape.

It seems from the results described above that the present test method could be useful for primary screening of antidepressants. Procedurally the test is easy to perform. We find that immobility in the mouse is even more readily identifiable than in the rat and is moreover much less subject to environmental disturbance. Although with the present procedure there is greater variability between animals than in the longer rat procedure (Porsolt *et al.*, 1977a, b), this is adequately compensated for by the increased number of animals studied per dose (10 instead of 5). In addition, the test is both rapid — one observer can evaluate a test drug (3 doses against a control group) within 3 hr — and requires a minimum of apparatus.

Pharmacologically the test appears to be valid. It is sensitive to tricyclic antidepressants and to M. A. O. I. of A, B and mixed types (Knoll, 1976; Neff and Fuentes, 1976; Kan *et al.*, 1977). More interestingly it is sensitive to several atypical antidepressants such as iprindole, mianserin and viloxazine whose mechanisms of action, although not well understood, differ radically from those of tricyclic antidepressants and M. A. O. I. (Gluckman and Baum, 1969; van Riezen, 1972; Greenwood, 1975). Indeed the antidepressant activity of mianserin was not even predicted from pharmacological tests but was discovered virtually by chance during EEG studies of normal volunteers (Itil *et al.*, 1972). The fact that all these compounds, despite their sometimes conflicting profiles of pharmacological and biochemical activity, show clear antidepressant effects on immobility in rats and mice suggests that our test method might be capable of detecting new types of antidepressants which might otherwise be missed using classical pharmacological tests.

*Acknowledgments*—We are grateful to the following companies for the gift of drugs: I. C. I. (Macclesfield, U. K.) for viloxazine; Lilly Research Laboratories (Indianapolis, U. S. A.) for Lilly 51641; Organon (Oss, N. L.) for mianserin; Wyeth Laboratories (Maidenhead, U. K.) for iprindole. We thank Michèle Fiquémont for expert secretarial assistance.

## References

- GLUCKMAN, M. I. and BAUM, T. The pharmacology of iprindole, a new antidepressant. *Psychopharmacology* 15, 169-185 (1969).
- GREENWOOD, D. T. Animal pharmacology of viloxazine (Vivalan). *J. int. med. Res.* 3, Suppl. 3, 18-30 (1975).
- ITIL, T. M., POLVAN, N. and HSU, W. Clinical and EEG effects of GB 94, a "tetracyclic" antidepressant (EEG model: discovery of a new psychotropic drug). *Curr. Ther. Res. Exp.* 14, 395-413 (1972).
- KAN, J. P., MALNOE, A. and STROLIN-BENEDETTI, M. Original MAO inhibitory properties of 3(3-methyl phenyl) 5-hydroxymethyl 2-oxazolidinone (toloxatone). *J. Pharm. Pharmacol.* (in press) (1977).
- KNOLL, J. Analysis of the pharmacological effects of selective monoamine oxidase inhibitors. In *Monoamine oxidase and its inhibition*, Ciba Foundation Symposium 39, 135-161, Elsevier/Excerpta Medica/North Holland, Amsterdam (1976).
- NEFF, N. H. and FUENTES, J. A. The use of selective monoamine oxidase inhibitor drugs for evaluating pharmacological and physiological mechanisms. In *Monoamine oxidase and its inhibition*, Ciba Foundation Symposium 39, 163-179, Elsevier/Excerpta Medica/North Holland, Amsterdam (1976).
- PORSOLT, R. D., LE PICHON, M. and JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-732 (1977a).
- PORSOLT, R. D., ANTON, G., BLAVET, N. and JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Europ. J. Pharmacol.* in press, (1977b).
- VAN RIEZEN, H. Different central effects of 5-HT antagonists mianserin and cyproheptadine. *Arch. int. Pharmacodyn.* 198, 256-269 (1972).

Received August 31, 1977.