

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Fenoles totales y actividad antioxidante del extracto  
atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana*  
Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017.

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

PRESENTADO POR:

**Bach. ALMEYDA RODAS, WILLIAM AUGUSTO**

AYACUCHO – PERÚ

2017



A mis padres, hermanos, novia e hijo  
Alejandro por brindarme siempre su  
apoyo y motivación.



## **AGRADECIMIENTO**

A mi *Alma Mater*, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga forjadora de profesionales de excelencia al servicio de la sociedad y del país.

A la Facultad de Ciencia de la Salud, a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica y en especial al “Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos”, a sus docentes por sus enseñanzas durante mi formación profesional.

A mi asesor, el Mg. Q.F. ARONÉS JARA, Marco Rolando por brindarme la oportunidad de contar con su capacidad profesional fundamentales para concretar la presente tesis.

A la Q.F. VILLANUEVA BAUTISTA, Violeta por el apoyo en la conducción del presente trabajo de investigación.

A todas las personas que me brindaron su apoyo en la conducción del presente trabajo de investigación, cuyos esfuerzos se materializan en este informe.



## ÍNDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE ANEXOS	XIII
RESUMEN	XV
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Antecedentes	5
2.2. <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl	6
2.2.1. Descripción taxonómica	6
2.2.2. Descripción botánica del género <i>Calceolaria</i>	7
2.2.3. Características botánicas de <i>Calceolaria engleriana</i>	7
2.2.4. Distribución geográfica (hábitat) de <i>Calceolaria engleriana</i>	8
2.2.5. Composición química	8
2.2.6. Relación estructura actividad de los metabolitos secundarios	9
2.2.7. Usos tradicionales	11
2.2.8. Obtención de extractos	12
2.2.9. Métodos de extracción	13
2.2.10. Control fisicoquímico de extractos	15
2.2.11. Radicales libres	15
2.2.12. Antioxidante	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Ubicación	19
3.2. Población y muestra	19
3.2.1. Población	19
3.2.2. Muestra	19
3.2.3. Criterios de inclusión y exclusión	19
3.2.4. Unidad de análisis	19
3.2.5. Sistema de muestreo	19
3.3. Procedimiento para la recolección de datos	20
3.3.1. Recolección y preparación de la muestra.	20
3.3.2. Obtención del extracto de la hidroalcohólico de la muestra	20
3.3.3. Concentración de la muestra	20

3.3.4. Obtención del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl “wawillay”	20
3.3.5. Identificación de compuestos químicos del extracto atomizado	21
3.3.6. Evaluación de los parámetros fisicoquímicos del atomizado	21
3.3.7. Determinación de la concentración de compuestos fenólicos totales	23
3.3.8. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto atomizado: Método DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazilo)	24
3.4. Tipo y diseño de investigación	25
3.4.1. Tipo de Investigación	25
3.4.2. Diseño de Investigación	25
3.5. Análisis de datos	25
IV. RESULTADOS	27
V. DISCUSIONES	37
VI. CONCLUSIONES	41
VII. RECOMENDACIONES	43
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
IX. ANEXOS	49



## ÍNDICE DE TABLAS

	Pg.
Tabla 1. Características fisicoquímicas del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017	28
Tabla 2. Identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017	29
Tabla 3. Análisis de varianza ANOVA para la determinación de equivalencia estadísticamente significativa del porcentaje de actividad antioxidante entre el ácido gálico (estándar) y el extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017	34
Tabla 4. Test de Tukey para la determinación de equivalencia estadísticamente significativa del porcentaje de actividad antioxidante entre el ácido gálico (estándar) y el extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay" Ayacucho 2017	35



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pg.
Figura 1. Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de compuestos fenólicos totales presentes en el extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017	30
Figura 2. Cuantificación de compuestos fenólicos totales (CFT) en equivalentes de ácido gálico (EAG) presentes en las muestras del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017	31
Figura 3. Curva de calibración de DPPH para la determinación del porcentaje de actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017	32
Figura 4. Porcentaje de actividad antioxidante por captación de radicales libres de ácido gálico en contraste con el extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017	33



## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pg.
Anexo 1. Certificado de identificación de la <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017	50
Anexo 2. <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", que crecen en zonas áridas, del centro poblado de Waraca anexo Anchachuasi provincia de Vinchos del departamento de Ayacucho 2017	51
Anexo 3. Procedimientos para la obtención del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017	52
Anexo 4. Concentración del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay" realizado en el Laboratorio de Control de Calidad de Farmacia y Bioquímica, Ayacucho 2017	54
Anexo 5. Recojo del concentrado del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017	54
Anexo 6. Fotografía del atomizador Spray Driver B290 realizando el proceso de atomización del concentrado de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay" en el Centro de Desarrollo de Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos, Ayacucho 2017	55
Anexo 7. Tamizaje fitoquímico del extracto atomizado de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay". Ayacucho 2017	56
Anexo 8. Flujograma de la preparación de las disoluciones a partir de las cuales se elaborará curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de compuestos fenólicos totales del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017	57
Anexo 9. Flujograma de la preparación de la muestra para la cuantificación de compuestos fenólicos totales del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017	58
Anexo 10. Flujograma de la preparación de las disoluciones a partir de las cuales se elaborará curva de calibración de DPPH para	59

la determinación del porcentaje de actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017

- Anexo 11. Flujograma de la preparación de ácido gálico para la determinación del porcentaje de actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017 60
- Anexo 12. Flujograma de la preparación de la muestra para la determinación del porcentaje de actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017 61
- Anexo 13. Datos descriptivos del ácido gálico y el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Ayacucho 2017 62
- Anexo 14. Matriz de consistencia 63

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se ejecutó en los laboratorios de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y en el Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se realizó con el objetivo de determinar la concentración de fenoles totales y la actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Se recolectó las hojas en el centro poblado de Anchac - Wasi (Huaraca) del distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho. El extracto atomizado se obtuvo en el atomizador Mini Spray Dryer B-290 a partir del concentrado del extracto hidroalcohólico, del cual se evaluó sus características organolépticas y fisicoquímicas, así como la cuantificación de los compuestos fenólicos totales por el método Folin-Ciocalteu y el porcentaje de actividad antioxidante por el método de DPPH. El extracto atomizado presentó un color marrón claro, olor *sui generis*, sabor amargo, aspecto resinoso, solubilidad en metanol y, pH de 6,34; humedad de 6,70 %, cenizas de 5,21% y un rendimiento de 6,8%. De la cuantificación de compuestos fenólicos totales se pudo determinar un promedio de  $15,9 \pm 0,5$  mgEAG/g extracto atomizado y un nivel de significancia de  $p > 0,05$  entre el porcentaje de actividad antioxidante del ácido gálico y el extracto atomizado a diferentes concentraciones.

**Palabras clave:** *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", extracto atomizado, actividad antioxidante.





## I. INTRODUCCIÓN

Los vegetales constituyen un amplio campo en la investigación farmacológica con grandes posibilidades para llegar al conocimiento de nuevas e interesantes drogas. Prueba de ello es la resolución de la XXXI Asamblea Mundial de la Salud, que en marzo de 1978 solicitó del director general de la OMS, que iniciara programas destinados a valorar la medicina tradicional.<sup>1</sup>

En los últimos años la búsqueda cada vez más intensa de nuevas sustancias farmacológicamente útiles incita a los científicos no sólo a sintetizar miles de nuevos compuestos, sino también a estudiar con más profundidad numerosas sustancias naturales, especialmente las obtenidas de plantas. Han aparecido nuevas consideraciones acerca de la utilidad de las plantas, de esta forma no se va buscando el principio activo causante de la acción, sino sustancias más o menos inertes capaces de dar moléculas con una fuerte actividad con leves cambios en su estructura.<sup>1</sup>

La amplia y variada flora peruana es y seguirá siendo uno de los recursos naturales más importantes por las investigaciones químicas y farmacológicas en estas plantas utilizadas en la medicina popular ha permitido que muchas industrias farmacéuticas elaboren productos a base de extractos de estos vegetales, con el fin de obtener un medicamento más seguro y estable, ya sea por proceso de liofilizado, atomizado y simple evaporación, los mismos que se comercializan como suplemento alimenticio, recurso natural y producto natural de uso en salud.<sup>2</sup>

Los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones UV, entre otros. Esta síntesis se da a partir de fenilalanina por la Vía del Shikimato. Juegan un rol vital en las plantas y regulan el metabolismo y síntesis de la lignina, por lo que las plantas presentan

un gran número de componentes fenólicos (flavanoles, flavonoles, chalconas, flavonas, flavanonas, isoflavonas, taninos, estilbenos, curcuminoides, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, etc).<sup>3</sup>

Los compuestos fenólicos son un gran grupo de antioxidantes naturales; consumo de fuentes importantes, particularmente de frutas, vegetales y cereales presentan efectos benéficos.<sup>4</sup>

La asociación entre una dieta rica en frutas y vegetales está relacionada a una disminución de riesgo de enfermedades cardiovasculares, y ciertas formas de cáncer, según evidencias epidemiológicas.<sup>5,6</sup>

Estos fitoquímicos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias que evidencian su rol protector sobre la salud humana.<sup>7</sup>

Diferentes estudios han mostrado que los radicales libres presentes en el organismo humano causan daño oxidativo a diferentes moléculas, tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y tiene que ver en la iniciación en algunas enfermedades degenerativas.<sup>5</sup>

Estos componentes antioxidantes son capaces de neutralizar radicales libres, y pueden jugar un rol importante en la modulación de detoxificación enzimática, estimulación del sistema inmune, disminución de la agregación plaquetaria y modulación del metabolismo hormonal.<sup>7</sup>

El presente trabajo de investigación está orientado a determinar la concentración de fenoles totales y el efecto antioxidante de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”. Porque esta planta también es usada como digestiva como uso tradicional por la población que vive en el campo y las personas que venden hierbas en el mercado.<sup>8</sup>

Es así que se decidió llevar a cabo su estudio en los Laboratorios de la Escuela de Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga cuyos resultados quedan plasmados en este informe, como resultado de un estudio a nivel experimental para lo cual se plantearon los siguientes objetivos:

#### **Objetivos Generales**

Determinar la concentración de fenoles totales y la actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”.

#### **Objetivos Específicos**

- Evaluación de los parámetros fisicoquímicos del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”.

- Cuantificar la concentración de fenoles totales del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”.
- Evaluar la actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”.



## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Casanova, realizó un estudio sobre el extracto acuoso liofilizado de *Calceolaria cuneiformis* Subsp. *cuneiformis* "Ayapa zapatum", en el cual se determinó una buena actividad antioxidante y antiulcerosa, debido a la presencia de metabolitos secundarios como los flavonoides y taninos, obteniéndose mejores resultados a la dosis de 125 µg/ml.<sup>9</sup>

Del Solar, estudió la actividad antioxidante de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", se encontró que la crema al 0,5 % con concentración de 100 µg/ml presentando mayor porcentaje de inhibición de radicales libres (99,46 ± 0,11 %); respecto a las cremas al 1,0 % y 2,0 % que presentaron porcentajes de 99,10 ± 0,46 % y 96,45 ± 0,53 % respectivamente.<sup>10</sup>

Romero y col, realizaron el tamizaje fitoquímico de la especie *Calceolaria engleriana* donde se demostró la presencia de compuestos fenólicos como: taninos, flavonoides y catequinas; los terpenoides como monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos y/o esteroides y las quinonas. Así mismo, reportan la actividad antibacteriana del extracto de las especies del género *Calceolaria*, frente a dos cepas gran positivas, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, tres cepas gran negativas *Escherichia coli*, *Salmonella tiphy* y *Pseudomonas aeuriginosa* y finalmente una levadura *Candida albicans*, donde se observa que la especie *Calceolaria engleriana* y *Calceolaria cuneiformis*, son las que tiene mayor actividad antimicrobiana.<sup>11</sup>

Harty, en un estudio sobre *Calceolaria chelidonioides* Humb, planta que pertenece a la familia Scrophulariaceae, se aislaron flavonoides, apigenina, quercetina y rutina, utilizando diferentes técnicas espectroscópicas. La evaluación de la actividad antioxidante, mediante el radical libre DPPH, mostró el siguiente orden con respecto a la energía para estas tres moléculas en la

reducción de la molécula de DPPH: apigenina, rutina y quercetina ( $CI_{50}$  en  $\mu\text{g/ml}$  =  $30,3 \pm 1,9$ ;  $23,7 \pm 2,4$  y  $18,8 \pm 2,1$ ), los flavonoides son bien conocidos antioxidantes y usando el DPPH.<sup>12</sup>

De la Cruz, realizó un estudio donde la actividad antioxidante de *Calceolaria rupestris* Molau "romero" se determinó por el método de captación del radical libre DPPH, evaluándose a las concentraciones de 300  $\mu\text{g/ml}$ , 600  $\mu\text{g/ml}$  y 900  $\mu\text{g/ml}$ , a diluciones de 1, 25, 50 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de cada uno de ellos respectivamente, expresándose los resultados como porcentaje de inhibición. Los mayores porcentaje de inhibición se obtuvieron a las diluciones de 100  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  y 25  $\mu\text{g/ml}$  de la concentración de 300  $\mu\text{g/ml}$  del extracto con un  $98,8 \pm 0,65$ ;  $99,0 \pm 0,46$  y  $86,5 \pm 6,46$  y a la concentración de 600  $\mu\text{g/ml}$  a las diluciones de 100  $\mu\text{g/ml}$  y 25  $\mu\text{g/ml}$  con un  $98,0 \pm 0,37$  y  $97,0 \pm 0,28$  de porcentaje de inhibición respectivamente.<sup>13</sup>

Goyti, realizó un estudio químico y farmacológico de un extracto activo de *Buddleja globosa hope*, *buddlejaceae* "matico" y diseño de la metodología analítica donde utilizo la estandarización química que permita la cuantificación de metabolitos activos por el método de *Folin ciocalteu* utilizando Acido gálico como estándar donde obtiene una lectura de ETMAT otoño de  $12,55 \pm 0,00$ , ETMAT verano de  $17,19 \pm 0,57$ , y EMG de  $14,48 \pm 0,00$  donde refiere que este método de cuantificación solo entrega la concentración de fenoles totales hidrosolubles sin valorar particularmente a aquellos metabolitos activos de interés farmacológico.<sup>14</sup>

## **2.2. *Calceolaria engleriana* Kraenzl**

### **2.2.1. Descripción taxonómica**

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	SCROPHULARIALES
FAMILIA	:	SCROPHULARIACEAE
GÉNERO	:	<i>Calceolaria</i> .
ESPECIE	:	<i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl
NOMBRE VULGAR	:	"wawillay"

Fuente: Constancia emitida por el Herbarium Huamangensis (Anexo 1)

### **2.2.2. Descripción botánica del género *Calceolaria***

El género *calceolaria* se caracteriza por ser plantas herbáceas anuales o perennes, algunas veces arbustos o sub arbustos pequeños, hojas alternas, opuestas y verticiladas sin estípula, flores amarillas solitarias o dispuestas en inflorescencias racimosas o cimosas, son hermafroditas, zigomorfas en mayor o menor grado, pentámeras. Cáliz con cinco sépalos iguales, lobados o con el posterior más o menos reducido; corola bilabiada, usualmente amarilla, también tubular o embudada, labio superior formado por las dos piezas corolinas adaxiales; labio inferior formado por las tres piezas corolinas adaxiales, sacciforme y de mayor tamaño que el labio superior, normalmente con una zona de tricomas glandulares secretoras de aceites llamado el aioforo. Estambres con dos o cuatro (dinamos), raras veces cinco, insertos en el tubo corolino. Ovario bilocular, bicarpelar, súpero o semiínfero, estilo entero bífido. Fruto cápsula o baya pluriseminada, dehiscente distalmente en cuatro valvas. Semillas pequeñas, casi lineares, elipsoides y algo recurvadas, con tejido nutritivo. Su clasificación abarca unas 3000 especies que habitan sobre todo en regiones de clima templado en zonas montañosas algunas tienen importancia medicinal y otras son muy apreciadas como plantas ornamentales.<sup>15</sup>

### **2.2.3. Características botánicas de *Calceolaria engleriana***

Sub arbusto erecto que alcanza de 0,2 a 1,2 m de altura, ramas rojizo marrones poco ramificado, con inflorescencia en cimas terminales multiflorales y parte distales de las ramas finamente tomentosa, pelos ascendentes, hojas herbáceas o subcoriaceas, lanceoladas (raramente ovado estrechamente elíptica), aguda cuneada o redondeada en la base, márgenes enteros deflexos de 2,8 – 8,2 por 0,9 – 2,6 cm de color verde olivo en ambos lados, haz tomentoso algo deslucido, envés pinnado venoso, las venas tomentosas, interespacios glabros, glándulas sésiles inflorescencia compuesta de 1-2 pares de cimas de ocho flores, pedúnculos primarios de 2,3 – 10 cm, pedicelos 1 – 3 – 4 cm, la cima presenta brácteas. Sépalo elíptico u ovado, de color amarillo limón, con pocos pelos glandulares en la cara externa, internamente con pelos cortos, corola profundamente amarilla con puntos amarillos en el interior de la garganta, labio superior 3-5 x 5 – 7 mm labio inferior porción incurvada 17 – 25 x 12 – 20 mm, estambres con anteras de color amarillo con tecas opuestas, con filamento estaminal corto, fruto cápsula ovoide acuminada y glandular.<sup>15</sup>

#### **2.2.4. Distribución geográfica (hábitat) de *Calceolaria engleriana***

Se sabe que la distribución de *Calceolaria* va del sur de la sierra Madre Occidental en México, hasta los Andes del sur, la mayoría de las especies están en alturas que oscilan los 2000 a 4000 msnm.<sup>16</sup>

Crece en zonas alto andinas y alcanzan su más alta diversidad en el norte de Perú, especialmente en el departamento de Cajamarca. Según el estudio realizado por el botánico Molau en el año 1983 *Calceolaria engleriana* Subsp. *Lutea* Molau es endémica de los andes centrales del Perú, siendo encontrado en los departamentos de Junín y Ayacucho; desarrollándose en las laderas de la “puna” en pendientes rocosas y matorrales de montañas secas, cerca de escorrentías de agua, canales de regadío, terrenos de cultivo en suelos franco arenosos y pedregosos, aproximadamente de 3000 a 3500 msnm.<sup>11</sup>

Su floración y recolección se da en los meses de primavera andina: abril, mayo, junio y julio, pero particularmente en el departamento de Ayacucho crece en los meses de lluvia de enero a abril, siendo escaso en agosto a diciembre.<sup>17</sup>

#### **2.2.5. Composición química**

Se han realizado diversos estudios sobre la composición química del género *Calceolaria*, identificando algunos compuestos químicos, como resultado de estudios fitoquímicos, donde se reportan la presencia de taninos, flavonoides, esteroides, quinolonas, cardenólidos, alcaloide, anillos lactona, triterpenos y en los últimos años han sido reportados muchos nuevos diterpenos.<sup>18</sup>

Silva et al., aislaron los diterpenos de las partes aéreas de *Calceolaria petiolaris*, llegando a identificarlos como: 18-maloniloxi-9-epi-eti-7, 15-primaradieno, 18-hidroxi-9-epi-ent-7, 15-pimaradieno, 18-acetoxi-9epi-ent-7, 15-pimaradieno y el Petiolato (un bis -diterpeno). Asimismo reportan que aislaron dos naftoquinonas de *Calceolaria* andina, identificadas como 2-(1,1-dimetilpro-2-enil)-3-hidroxi-1, 4-naftoquinona y su correspondiente acetato, el 2-acetoxi-3-(1,1-dimetilpro-2-enil)-3-hidroxi-1, 4 - naftoquinona.<sup>18</sup>

Romero et al., en el trabajo de investigación realizado sobre el género *Calceolaria* en 6 especies, siendo una de ellas la *Calceolaria engleriana* Kraenzl determinaron la presencia de compuestos fenólicos como taninos, flavonoides y catequinas; los terpenoides como monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos y/o esteroides, corroboradas por cromatografía en capa fina y pruebas espectrales.<sup>11</sup>



Pérez R, menciona que estudiaron 22 especies de la familia Scrophulariaceae demostraron la presencia de flavonas y flavonoles metoxilados.<sup>19</sup>

#### **2.2.6. Relación estructura actividad de los metabolitos secundarios**

La detección de los principios activos es importante pues permite corroborar o rechazar las propiedades atribuidas a la planta y a la vez detectar nuevas posibles aplicaciones. Por otra parte, el conocimiento de los metabolitos secundarios facilita la dosificación y en algunos casos la administración, no obstante, existe la tendencia al uso de los extractos o polvo obtenidos de las plantas o sus órganos.<sup>20</sup>

- **Fenoles ácidos y ácidos fenólicos**, algunos de los compuestos químicos bioactivos más sencillos son derivados mono sustituidos del anillo fenol. Entre ellos destacan el ácido caféico y el ácido cinámico, donde reportan que el ácido caféico es eficaz frente a bacterias, hongos y virus. La posición y el número de grupos hidroxilo del grupo fenol parece influir en el efecto antimicrobiano de tal forma que a mayor grado de hidroxilación mayor poder tóxico y mayor poder inhibitorio. El mecanismo responsable del efecto antimicrobiano de los fenoles parece estar relacionado con procesos de inhibición enzimática por parte de los compuestos oxidados, posiblemente a través de reacciones con grupos sulfhídricos o a través de interacción con proteínas. Los aceites esenciales de los compuestos fenólicos también destacan por su poder antimicrobiano.<sup>20</sup>
- **Quinonas**, son anillos aromáticos que presentan dos grupos cetónicos su capacidad para formar complejos irreversibles con los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas establece su potencial como agentes antimicrobianos al conducir a la inactivación y pérdida de función de estas proteínas. Asimismo, y de manera secundaria, las quinonas pueden inducir la formación de sustratos no asimilables por los microorganismos.<sup>20</sup>
- **Flavonas, flavonoides y flavonoles**, son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo. Estas sustancias son producidas de manera natural por las plantas como respuesta a procesos infecciosos, por lo que no se extraña que se haya demostrado in vitro su eficacia antimicrobiana frente a una amplia variedad de microorganismos. Su actividad es debida probablemente, a su capacidad para formar complejos con proteínas solubles extracelulares y con la pared celular de la bacteria, de forma análoga a las quinonas. Los flavonoides poseen, asimismo efectos

inhibitorios frente a múltiples virus. Existen numerosos estudios que demuestran su eficacia frente al virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).<sup>20</sup>

- **Catequinas y leucoantocianinas**, ambas tienen el núcleo de flavan-3-ol en su estructura. Las catequinas sólo tienen el OH en la posición 3 del anillo C, mientras que las leucoantocianinas tienen dos OH en las posiciones 3 y 4 (flavan-3,4-diol). Por polimerización producen taninos condensados o catéquinos. Al calentarlas en medio ácido, las leucoantocianinas se transforman parcialmente en antocianidinas y aparece coloración roja que permite su identificación.<sup>21</sup>
- **Saponinas**, son heterósidos (azúcar y aglicón) que se caracterizan por su capacidad para producir espuma cuando se agita una solución acuosa que las contiene. Se forma espuma debido a que las saponinas disminuyen la tensión superficial del agua. Son por lo tanto tensioactivos naturales. Las principales acciones reconocidas para las saponinas de diferentes especies son: irritante de las células, efecto antiedematoso y antiinflamatorio, acción antihemorroidal y cicatrizante, acción adaptógena, efecto antimicrobiano, antimicótico y molusquicida.<sup>21</sup>
- **Taninos**, bajo esta denominación se incluyen un grupo de derivados fenólicos poliméricos de distinto peso molecular. Se les ha asignado distinto efecto como estimulación de células fagocitarias, actividad antitumoral y un amplio espectro antibacteriano. Así pues, su acción antimicrobiana puede estar relacionada con su capacidad para inactivar las adhesinas de microorganismos, enzimas, proteínas de transporte de la cubierta celular. Los estudios publicados reflejan que los taninos también pueden ser tóxicos frente a hongos filamentosos y levaduras. Los taninos condensados son capaces de unirse a la pared celular de las bacterias presentes en el rumen de los herbívoros, impidiendo su crecimiento y actividad proteasa.<sup>20</sup>
- **Cumarinas**, son compuestos fenólicos resultante de la fusión del anillo de benceno y una alfa pirona. Como grupo las cumarinas tienen propiedades antimicrobianas por su capacidad estimuladora de macrófagos que incide de forma directa en el proceso infeccioso. Algunas de ellas se han empleado por sus efectos antivíricos (warfarina), mientras que otras, como los ácidos hidroxinámicos, son inhibidores de microorganismos gram positivos y las

fitoalexinas, derivado hidroxilados de las cumarinas tienen actividad antifúngica.<sup>20</sup>

- **Terpenoides**, los aceites esenciales también denominados terpenoides, son metabolitos secundarios altamente enriquecidos en compuestos con una estructura básica isoprenoide. Respecto al espectro de la actividad antimicrobiana, cerca del 60 % de los aceites esenciales conocidos son inhibitorios frente a hongos y un 30 % frente a bacterias, aunque también hay evidencias de su acción sobre virus y protozoos.<sup>20</sup>
- **Alcaloides**, se trata de compuestos heterocíclicos nitrogenados. Los alcaloides diterpenoides, aislados principalmente a partir de plantas de la familia Ranunculáceas, son bien conocidas por sus propiedades antimicrobianas. Así, la solamargina, un glicoalcaloide aislado de las vallas del *Solanum khasianum*, es eficaz frente al virus VIH así como frente a patógenos intestinales que producen gastroenteritis en pacientes con SIDA.<sup>20</sup>
- **Lecitinas y compuestos polipéptidos**, la capacidad antimicrobiana de estos compuestos se conoce desde hace tiempo. En 1942 se publicaron las primeras evidencias de los efectos antimicrobianos de los péptidos, concretamente de una lipoproteína aislada de la harina de trigo. Los péptidos con capacidad antimicrobiana son moléculas de la defensa inmunitaria natural que tienen efectos directos sobre bacterias, hongos y virus con envoltura.<sup>20</sup>

### 2.2.7. Usos tradicionales

En el empleo de la medicina tradicional a la planta silvestre *Calceolaria engleriana* Kraenzl se le atribuye ciertas propiedades medicinales como: diurético, digestivo astringente, febrífugo, antiulceroso e hipoglucemiante también se le describe por su uso para la tos, resfrió y retraso menstrual; éstas son usadas en forma de infusión las hojas y flores frescas tomándolas después de los alimentos.<sup>19</sup>

Del Castillo, menciona que hay otras especies como: *Calceolaria engleriana subsp. Lutea* Molau que se utiliza como hipoglucemiante (esta propiedad se le atribuye a la planta entera); *Calceolaria deflexa* R&P, especie silvestre que se utiliza como “llipta” para el chacchado de la coca; *Calceolaria cuneiforme* R&P, se utiliza como diurético en infecciones uterinas, como infusión de toda la planta y como cosmético quita las manchas de la piel y el polvo de la flor elimina cicatrices; *Calceolaria herzogiana* kran, es una especie silvestre utilizada para

problemas estomacales; *Calceolaria pinnata*, especie silvestre distribuida entre la costa y la sierra y es utilizada como diurético; *Calceolaria santolinoides* Kraenzl, posee floración estival y sus órganos aéreos se emplean en medicina tradicional como facilitadores del parto, aplicación que se proyecta también como abortiva; *Calceolaria herbeo-hybrida*, se encuentra en la costa como una especie cultivada ornamentalmente.<sup>22</sup>

#### **2.2.8. Obtención de extractos**

Los métodos y técnicas operatorias a seleccionar para realizar la extracción y/o aislamiento de principios activos de un material vegetal, depende de diversos factores, siendo entre ellos fundamentales:

- Tipo de sustancias en cuestión (naturaleza química).
- Contenido de agua.
- Grado de fragmentación (tamaño de partículas).
- La temperatura y su influencia sobre la solubilidad y la descomposición de las sustancias.
- Estabilidad o labilidad del producto.
- Selección del disolvente o menstruo.
- Cambios en la relación de partición sólido/líquido.
- Recuperación del soluto según la proporción de partición.
- Formación de emulsiones.
- Costo del proceso.
- Trabajo involucrado, reproducibilidad y factibilidad.
- Eficiencia del proceso extractivo.

En el mercado farmacéutico hallamos cuatro tipo de extractos: extractos secos, extractos blandos, extractos hidroalcohólicos (fluidos y tinturas) y extractos oleosos. En todos ellos la concentración de principios activos es óptima, facilitándose la dosificación de los mismos.

- Extractos secos, se obtiene por la concentración de los licores extractivos mediante evaporación al vacío o por atomización.
- Extractos blandos, son masas semisólidas, se obtiene por concentración de los licores extraídos sin llegar a sequedad.
- Extractos hidroalcohólicos, son los que extraen la mayor diversidad de componentes químicos presentes en drogas.<sup>23</sup>

### 2.2.9. Métodos de extracción

Las principales técnicas extractivas son: maceración, lixiviación o percolación, digestión, infusión, destilación y extracción continua.

- a. Maceración**, consiste sencillamente en remojar la droga o sustancia, debidamente fragmentada, en un menstuo, hasta que éste penetre muy bien en la estructura celular y se ablanden y disuelvan las porciones solubles. Se pone la droga en un frasco con el disolvente, se tapa bien y se agita de cuando en cuando por un periodo de dos a cuatro días; luego se decanta el líquido, se exprime el residuo para evitar pérdida y se filtran los líquidos mezclados. La maceración es una de las operaciones que recomiendan las Farmacopeas europeas para preparar tinturas. Se maceran las drogas en determinada cantidad de menstuo, que puede ser alcohol de concentraciones diversas, éter, éter y alcohol o algún otro disolvente que se especifique. Se requiere cierto tiempo para la maceración y para la preparación de algunas tinturas se recomienda agitación. Por lo general se ejecuta la operación a la temperatura ordinaria. La Farmacopea suiza recomienda hacer la maceración en un frasco tapado y en un lugar oscuro. Luego se separa el líquido por coladura o exprimiendo el residuo insoluble, y después que se deja asentar, se filtra. Se ha de evitar cuanto sea posible la evaporación durante la filtración. La maceración no tiene ninguna ventaja sobre la lixiviación para confeccionar gran número de preparados líquidos de drogas, a menos que la segunda se haga descuidadamente o por persona inexperta. Si el operador no tiene ningún conocimiento del proceso de lixiviación, es más segura la maceración, que no requiere ninguna particular destreza ni criterio alguno, el remojo se concluye a su debido tiempo, y la separación del líquido absorbido, aunque es una operación laboriosa y sucia, tiene, cuanto menos, la ventaja de producir una tintura de concentración uniforme; si no se hace bien la expresión, acarrea pérdidas pecuniarias a causa de menor rendimiento, más el preparado final representa debidamente a la droga. La maceración se debe efectuar a temperatura de 15 a 20°C.<sup>24</sup>
- b. Lixiviación**, se pone un polvo en un vaso cilíndrico que tenga un diafragma en su parte inferior y se vierte sobre aquél algún líquido que tenga la propiedad de disolver parte de su sustancia, la porción de líquido que se pone primero en contacto con él, al pasar hacia abajo, produce su efecto disolvente en las capas sucesivas del polvo, hasta quedar saturado, y es

impelido hacia abajo por su propio peso y por la presión de la columna del líquido que gravita sobre él, menos la fuerza capilar con que el polvo tiende a retenerlo. Las fuerzas físicas que tienen parte importante en la lixiviación son las siguientes: gravedad, viscosidad, adherencia, fricción, ósmosis, capilaridad y solución. Si la cantidad de líquido que se añade no es más que bastante para satisfacer la capilaridad del polvo, ninguna porción de él pasa por el diafragma; mas la porción de líquido que se añade por arriba desaloja a la que fue absorbida por el polvo, sin mezclarse perceptiblemente con ella y ocupa su lugar, para luego ser desalojada por las nuevas porciones de líquido. El aparato en el que se deposita el polvo se denomina lixivador o percolador; el líquido que se vierte sobre el polvo es el menstuo; e líquido que sale del lixivador llevándose los principios solubles después de extraer sus componentes solubles se conoce con el nombre de borra.<sup>24</sup>

**c. Digestión**, la digestión es una forma de maceración que consiste en aplicar calor moderado a la sustancia que está siendo tratada. Se ejecuta en aquellos casos en que no perjudican las temperaturas moderadamente altas, y con ellas se acrecienta el poder disolvente del menstuo. Si éste es volátil, es necesario conectar un condensador de reflujo al vaso en que se hace la digestión, de suerte que el disolvente condensado vuelve a vaso y no hay merma de la cantidad empleada.<sup>24</sup>

**d. Destilación**, el término destilación se aplica a dos clases de operaciones: 1) cuando se vaporiza un solo componente de una solución y luego se condensa, como en la preparación de agua destilada; 2) cuando la evaporación da una mezcla de componentes en el vapor, del cual se separa una o más sustancias en la forma más pura posible.

Se emplean dos métodos principales de destilación: mediante el primero se separa y condensa el vapor producido por a ebullición de una mezcla líquida, de tal manera que nada de la porción condensada vuelve al aparato destilador. En el segundo método una parte de la porción condensada vuelve al aparato y se pone en íntimo contacto por contracorriente con el vapor que fluye en dirección al condensador.<sup>24</sup>

Para separar los componentes de una mezcla, es necesario que la composición del vapor que se forma en la destilación sea diferente de la de líquido de donde emana. Si es idéntica la composición de ambas fases, no se pueden separar los componentes de la mezcla.<sup>24</sup>

### **2.2.10. Control fisicoquímico de extractos**

El empleo de métodos físico-químicos de análisis, permite establecer la calidad de los extractos obtenidos a partir de drogas crudas, así como controlar su estabilidad. Para la determinación de los parámetros de calidad de un extracto o de un aceite esencial, son empleados algunos métodos:

- a. Determinación de los requisitos organolépticos.
  - Determinación de olor; se toma un tira de papel secante, se introduce un extremo en la muestra, se huele y se determina si corresponde con la característica del producto.
  - Determinación de color; se toma un tubo de ensayo, se llena con la muestra hasta las tres cuartas partes, y se observa el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación de capas.
- b. Determinación de la densidad relativa.
- c. Determinación del índice de refracción.
- d. Determinación del pH de extractos y tinturas.
- e. Determinación de sólidos totales.
- f. Determinación del contenido alcohólico.
- g. Análisis capilar.<sup>23</sup>

### **2.2.11. Radicales libres**

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, señalizado por el punto situado a la derecha del símbolo. Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar. Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas ubicuitarias y difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo.

No obstante lo expresado anteriormente, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo como la de que participan en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, favorecen la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis

de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis.

Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicáticas, pero que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes prooxidantes y son las especies reactivas del oxígeno (EROS). Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son:<sup>25</sup>

- Radical hidroxilo (HO)<sup>+</sup>
- Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)
- Oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)
- Oxígeno nítrico (NO)
- Peróxido (ROO)
- Semiquinona (Q)
- Ozono

#### **2.2.12. Antioxidante**

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de un sustrato oxidable, actuando como donador de electrones (agente reductor).

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía, liberan radicales libres, lo cual es incompatible con la vida a menos que existan mecanismos celulares de defensa que los neutralice. Los niveles bajos de antioxidantes, o la inhibición de las enzimas antioxidantes causan estrés oxidativo y pueden dañar o matar las células.<sup>26</sup>

- **Clasificación:**

- a. **Endógenos:** Enzimas: catalasa, superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasas, tioredoxina-reductasas y sulfocimetionina-reductasas.

- b. **Exógenos:** No enzimáticos, las vitaminas: vitamina E y C, los betacarotenos, los flavonoides y los licopenos, fitoestrógenos polifenoles, glutatión, ácido úrico, ubiquinol (Co-enzima Q), melatonina.

Además de las vitaminas, los oligoelementos como el cobre, el zinc, el manganeso, el selenio y el hierro son necesarios incorporarlos al organismo a través de la dieta, porque conforman la parte activa del núcleo de las enzimas antioxidantes.



- **Mecanismos de acción:**

Los antioxidantes pueden prevenir o retardar la oxidación de un sustrato biológico, y en algunos casos revertir el daño oxidativo de las moléculas afectadas.

Según el mecanismo de acción, se clasifican en:

- a. Antioxidantes preventivos: Al comienzo de una cadena de oxidación (reductores de peróxidos orgánicos e inorgánicos) ej: enzimas, glutatión peroxidasa, catalasa y peroxidasa.
- b. Antioxidantes secundarios: bloqueando en alguna etapa la cadena de oxidación, una vez iniciada, captando radicales libres. Ej: vitamina E y C, enzima superóxido dismutasa.<sup>26</sup>



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación**

El presente trabajo de investigación se ejecutó en los laboratorios de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y en el Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

#### **3.2. Población y muestra**

##### **3.2.1. Población**

Hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, que crecen en zonas áridas, del centro poblado de Waraca anexo Anchachuasi provincia de Vinchos del departamento de Ayacucho.

##### **3.2.2. Muestra**

2 Kg de hojas desecadas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, fueron recolectadas durante el mes de enero en horas de la mañana. Posteriormente se certificó la especie en el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, a partir de los cuales se realizó el extracto hidroalcohólico, siguiendo las recomendaciones establecidas para estos casos.

##### **3.2.3. Criterios de inclusión y exclusión**

Se tomó en consideración las hojas *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, que estén en buen estado excluyendo las que estén dañadas o en mal estado.

##### **3.2.4. Unidad de análisis**

Extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”

##### **3.2.5. Sistema de muestreo**

No probabilístico por conveniencia

### **3.3. Procedimiento para la recolección de datos**

#### **3.3.1. Recolección y preparación de la muestra.**

Se recolecta al azar las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay” en horas de la mañana, se lavaran y se secarán a temperatura de ambiente, en un lugar con buena ventilación, cambiando el papel de soporte y removiendo el vegetal para evitar su descomposición, por un periodo de cinco a ocho días según las directrices de la OMS.<sup>2</sup>

#### **3.3.2. Obtención del extracto de la hidroalcohólico de la muestra**

Luego del secado de la planta se procedió al deshojado de las hojas para ser reducidas de tamaño utilizando el molino de cuchilla hasta obtener un pulverizado uniforme, obteniendo un molido de 985 g, luego se procedió a ser humectada en un recipiente de vidrio con tapa (proteger el recipiente de la luz) con 800 ml de alcohol de 70° durante 12 h. Transcurrido el tiempo de humectación se transfirió la muestra a un agitador mecánico (mezclador de sólidos modelo cilindro).<sup>27</sup>

Teniendo la muestra en el agitador mecánico (mezclador de sólidos modelo cilindro) se cubrió el orificio de salida con gasa y algodón, la muestra se cubrió con el solvente hasta que este quede 3 - 5 cm por encima de ella, se maceró durante 24 h, luego del cual se abrió la llave de salida del agitador mecánico (mezclador de sólidos modelo cilindro) con una agitación permanente por cinco días dejando salir el percolado a razón de 20 gotas por minuto (agregando continuamente el solvente y este de 3-5 cm de la muestra), y se recibió el percolado y se filtró.<sup>27</sup>

#### **3.3.3. Concentración de la muestra**

Se procedió a concentrar el extracto empleando un evaporador en el que se vertió la muestra y se le adicionó vapor hasta llegar a una temperatura de 60°C y una presión de - 400 Pa, el evaporador se encontraba conectado a un condensador desmontable por el cual se extrae el solvente hasta obtener un concentrado con una cantidad de alcohol entre 7 – 10 % para proceder a su atomización.<sup>27</sup>

#### **3.3.4. Obtención del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”**

Finalmente se reunieron todos los líquidos extractivos y se secó por atomización utilizando el Atomizador Mini Spray Dryer B-290 y el producto obtenido se

envasó en un recipiente herméticamente cerrado, pues el extracto atomizado es muy higroscópico.<sup>27</sup>

### **3.3.5. Identificación de compuestos químicos del extracto atomizado**

La identificación de los diferentes compuestos químicos (metabolitos secundarios) del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay” fue realizada siguiendo los procedimientos de Miranda y Cuéllar.<sup>23</sup>

### **3.3.6. Evaluación de los parámetros fisicoquímicos del atomizado**

Una vez obtenido el extracto atomizado, se evaluaron los parámetros físico-químicos, que a continuación se señala.<sup>23</sup>

#### **a) Determinación de las características organolépticas**

**Color:** Se colocó la muestra en un tubo de ensayo hasta las tres cuartas partes y se obtuvo el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas.<sup>28</sup>

**Olor:** Se tomó una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo e introdujo en un extremo de la muestra del ensayo. Determinando si corresponde con las características del producto.

Los términos para describir los olores de la droga son: aromático, aliáceo, alcanforado, nauseabundo, desagradable, a especia, etc.<sup>28</sup>

**Sabor:** Se tomó una cantidad suficiente y se colocó en una luna reloj, luego hacer contacto con la lengua y determinar el tipo de sabor (dulce, amargo, ácido, salino, astringente, punzante, nauseabundo, aromático, etc).<sup>28</sup>

**Aspecto:** Se tomó cantidad suficiente de muestra y se colocó en una luna de reloj, se observó y se determinó el aspecto de la muestra.<sup>28</sup>

#### **b) Determinación de la solubilidad**

Para determinar la solubilidad de extracto seco se pesó un gramo de muestra y se vació en un tubo de ensayo, el cual se le adicionó 1 mL de disolvente (agua, alcohol o cloroformo), agitar y observar, en caso de no disolverse aumentar el disolvente a 10 mL, así sucesivamente para 30 mL, 100 mL; 1 L y más 10 L.<sup>28</sup>

#### **c) Determinación de pH**

La medición del pH se llevó a cabo mediante el pH-metro de mesa, para ello se preparó una solución reguladora de pH, para rango de 0-7. Una vez preparada la solución reguladora, se ajustó el equipo al rango en que se realizó la determinación. Posteriormente se determinó el valor del pH de la muestra.<sup>29</sup>

#### d) Determinación del contenido de humedad

Se pesó 2 g. de la muestra de ensayo con desviación permisible de 5 mg y se transfirió a una cápsula de porcelana previamente tarada y desecada, seguidamente se desecó a 105 °C durante tres horas. La cápsula se colocó en la desecadora donde se deja enfriar a temperatura ambiente y se pesa, colocándose nuevamente en la estufa durante una hora, volviéndose a pesar, hasta obtener una masa constante.<sup>29</sup>

Cálculo:

$$Hg = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Donde:

Hg = Pérdida en peso por desecación (%)

M = Masa de la cápsula vacía (g)

M<sub>1</sub> = Masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

M<sub>2</sub> = Masa de la cápsula con la muestra de ensayo (g)

100 = Factor matemático.

#### e) Determinación del contenido de cenizas

Se pesó no menos de 2 g ni más de 3 g de la muestra de ensayo, con una desviación permisible de 5 mg en un crisol de porcelana o platino previamente tarado. Se calienta suavemente la muestra de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar y posteriormente incineré en una mufla a una temperatura de 700 a 750 °C, si no se señala otra temperatura en la norma específica, durante dos horas. Se enfría el crisol en una desecadora y se pesa, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de cinco mg por g para obtener la masa constante los intervalos entre calentamiento y pesada son de 30 min. Si el residuo presenta trazas de carbón, se le añaden unas gotas de solución de peróxido de hidrógeno concentrado, ácido nítrico o solución de nitrato de amonio al 10 % m/v y se calienta hasta evaporar los solventes. Al enfriar el crisol el residuo es de color blanco o casi blanco.<sup>29</sup>

Cálculo:

$$C = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Donde:

C = porcentaje de cenizas totales en base hidratada

- M = masa del crisol vacío (g)  
M<sub>1</sub> = masa del crisol con la porción de ensayo (g)  
M<sub>2</sub> = masa del crisol con la ceniza (g)  
100 = factor matemático.

### 3.3.7. Determinación de la concentración de compuestos fenólicos totales

Se determinó de acuerdo al método de Stintzing et al, el cual utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu. El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, la cual es reducida a óxidos azules de tungsteno y molibdeno durante la oxidación fenólica. Esta reducción ocurre bajo condiciones alcalinas mediante la presencia de carbonato de sodio. La coloración azul es monitoreada a una longitud de onda de 765 nm y refleja la cantidad total de polifenoles usualmente expresado como equivalentes de ácido gálico (EAG) o equivalentes de catequina.<sup>30</sup>

#### Desarrollo de la técnica

- **Preparación de la curva de calibración de ácido gálico:**

Solución madre de ácido gálico: Se pesó 2 mg del mismo, se disolvió en agua destilada y se enrasó a un volumen de 10 mL para obtener una solución madre con concentración 0,2 mg/mL.

**Procedimiento:** Se pipetea a partir de la disolución madre de ácido gálico las siguientes alícuotas: 50, 100, 150, 200, 250 µL y se adicionó a continuación 200 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 2 mL de carbonato de sodio al 7 %. Se completa con agua destilada hasta un volumen de 5 mL. Transcurridos 30 minutos se midió la absorbancia a 765 nm, utilizando la solución preparada con el mismo procedimiento sin la muestra como blanco.

- **Muestras:**

**Procedimiento:** Se tomará directamente del extracto 30 µL, se transfirió a un volumétrico de 5 mL, adicionando a continuación 50 µL del reactivo de FolinCiocalteu, 1 mL de carbonato de sodio al 7 % y finalmente se completó a un volumen de 5mL con agua destilada. Luego de transcurrir 30 minutos y se midió la absorbancia de cada uno a 765 nm contra el blanco preparado de igual forma sin la muestra. La cantidad de compuestos fenólicos en cada extracto fue determinada en miligramos de contenido fenólico equivalentes de ácido gálico/g de extracto, utilizando la ecuación obtenida en la curva de calibración del ácido gálico.<sup>30</sup>

### 3.3.8. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto atomizado: Método DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazilo).

Se hizo la evaluación cuantitativa de la actividad antioxidante siguiendo la metodología descrita en la literatura, con modificaciones menores, el seguimiento del consumo de DPPH radicales libres por las muestras, mediante la medición de la disminución de la absorbancia de las soluciones a concentraciones diferentes. Estas mediciones se hicieron en UV-Vis espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm, y como la rutina de control positivo y ácido gálico. Construcción de la curva de calibración DPPH.

#### Construcción de la curva de calibración de DPPH

En primer lugar, se prepararon 50mL de la solución madre DPPH en metanol a una concentración de 40ug/mL, almacenando en el refrigerador y protegido de la luz. Se hicieron diluciones 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 y 1 µg/mL. La curva de calibración se construyó a partir de los valores de absorbancias a 515 nm de todas las soluciones (1 a 40 ug/mL), medida en cubeta de vidrio 1 cm y teniendo como blanco el metanol. Las medidas de absorbancia se realizaron por triplicado en intervalos de 1 min entre cada lectura.

Lea las mediciones de absorbancias de las muestras de extractos de EtOH (500ug/mL) y controles positivos en metanol se diluyeron a concentraciones de 250, 200, 150, 100, 50 y 25 mg/mL. Las medidas de absorbancia de las mezclas de reacción (0,3 mL de la solución de muestra o control positivo y 2,7 mL de la solución madre de DPPH a la concentración de 40ug/mL) se hicieron a 515 nm a 1, 5 y 10 min, cada 10min, 1 hora hasta su finalización. Una mezcla de metanol (2,7 mL) y la solución extracto metanólico (0,3 mL) se utilizó como blanco.

Los valores de absorbancia a todas las concentraciones ensayadas son en tiempo 30 minutos, también se convirtieron en porcentaje de actividad antioxidante (AA) determinada por la ecuación:<sup>31</sup>

$$\%AA = \frac{\{[Abs_{control} - (Abs_{muestra} - Abs_{blanco})] \times 100\}}{Abs_{controle}}$$

Donde:

$Abs_{control}$  : Es la absorbancia inicial de la solución de metanol DPPH.

$Abs_{muestra}$  : Es la absorbancia de la mezcla de reacción (DPPH + muestra).



### 3.4. Tipo y diseño de investigación

#### 3.4.1. Tipo de Investigación

Básico - experimental.<sup>32</sup>

#### 3.4.2. Diseño de Investigación

Diseño con post prueba únicamente y grupo control.

<b>RG<sub>1</sub></b>	<b>X</b>	<b>O<sub>1</sub></b>
<b>RG<sub>2</sub></b>	<b>-</b>	<b>O<sub>2</sub></b>

R: Asignación al azar o aleatoria

G: Grupo de sujetos (G<sub>1</sub>, grupo 1; G<sub>2</sub>, grupo 2; etc.)

X: Tratamiento, estímulo o condición experimental.

O: Medición experimental.

- : Ausencia de estímulo. Indica grupo control o testigo<sup>32</sup>

### 3.5. ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos fueron procesados y analizados mediante el programa Microsoft Excel. Los datos cualitativos como las características organolépticas, se reportó en cuadros. Para los datos de pH, y cuantificación de fenoles se calculó la media y el error estándar de la media.

Los promedios de la actividad antioxidante obtenidos por el DPPH del extracto atomizado se representan en gráficas y se realizó el análisis de varianza para identificar diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) aplicándose ANOVA y comparaciones múltiples con el Test de Tukey.



## **IV. RESULTADOS**

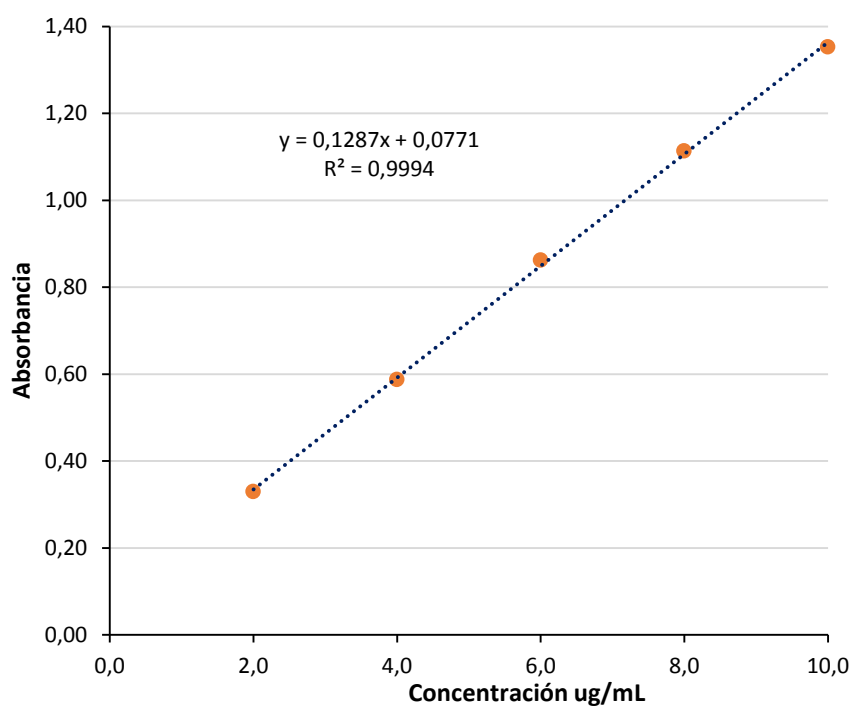
**Tabla 1.** Características fisicoquímicas del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, Ayacucho 2017.

<b>Características</b>	<b>Ensayos</b>	<b>Resultados</b>
Organoléptico	color	Marrón claro
	olor	<i>Sui generis</i>
	sabor	Amargo
	aspecto	Resinoso
Solubilidad	agua	Poco soluble
	metanol	Soluble
pH	agua	6,34
Humedad	pérdida por desecación	6,70 %
Cenizas	cenizas totales	5,21 %

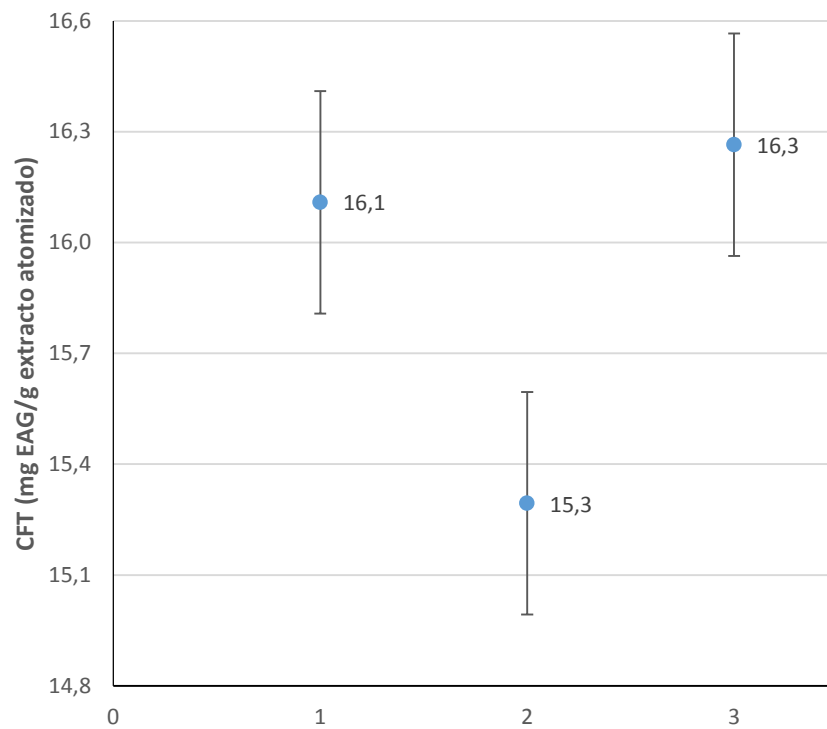
**Tabla 2.** Identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017.

<b>Metabolitos secundarios</b>	<b>Resultados</b>	<b>Observaciones</b>
Catequinas	++	mancha verde carmelita a la luz UV
Lactonas y/o Cumarinas	++	coloración rojiza
Saponinas	+++	formación de espuma
Flavonoides	++	fase amílica de color amarillo intenso
Fenoles y/o Taninos	+++	coloración verde
Quinonas	++	fase acuosa alcalina color rojo
Triterpenos y/o Esteroides	+++	coloración verde oscuro
Azúcares	+++	precipitado rojo

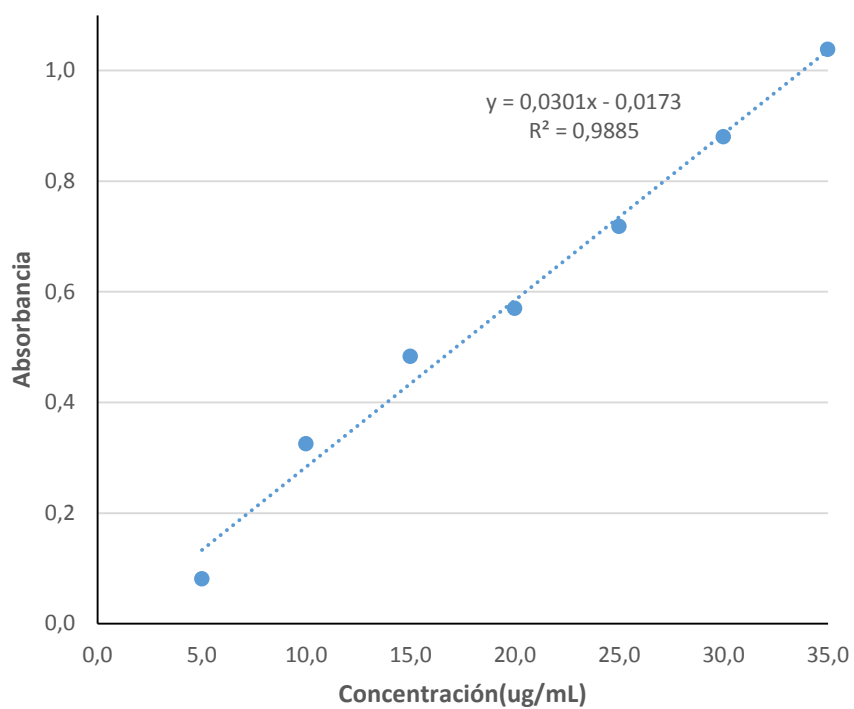
**LEYENDA:** (-): Ausente (+): Escasa (++) : Bastante (+++) : Muy abundante



**Figura 1.** Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de compuestos fenólicos totales presentes en el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017

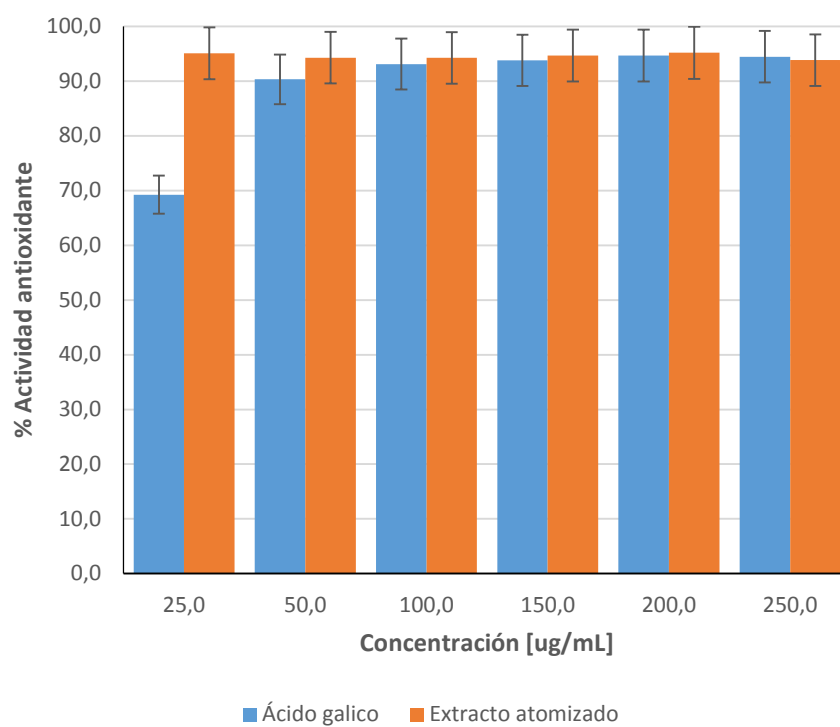


**Figura 2.** Cuantificación de compuestos fenólicos totales (CFT) en equivalentes de ácido gálico (EAG) presentes en las muestras del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay, Ayacucho 2017.



**Figura 3.** Curva de calibración de DPPH para la determinación del porcentaje de actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017.





**Figura 4.** Porcentaje de actividad antioxidante por captación de radicales libres de ácido gálico en contraste con el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017.

**Tabla 3.** Análisis de varianza ANOVA para la determinación de equivalencia estadísticamente significativa del porcentaje de actividad antioxidante entre el ácido gálico (estándar) y el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4625,2	11	420,5	26,9	$5,4 \times 10^{-23}$
Dentro de grupos	1315,3	84	15,7		
Total	5940,5	95			

**Tabla 4.** Test de Tukey para la determinación de equivalencia estadísticamente significativa del porcentaje de actividad antioxidante entre el ácido gálico (estandar) y el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" Ayacucho 2017.

Concentración (ug/mL)	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Ácido gálico [25ug/mL]	8	69,2	
Ácido gálico [50ug/mL]	8		90,3
Ácido gálico [100ug/mL]	8		93,1
Ácido gálico [150ug/mL]	8		93,8
Extracto atomizado [250ug/mL]	8		93,8
Extracto atomizado [100ug/mL]	8		94,2
Extracto atomizado [50ug/mL]	8		94,3
Ácido gálico [250ug/mL]	8		94,4
Ácido gálico [200ug/mL]	8		94,6
Extracto atomizado [150ug/mL]	8		94,7
Extracto atomizado [25ug/mL]	8		95,1
Extracto atomizado [200ug/mL]	8		95,8
Sig.		1,0	0,4

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 8,000.



## V. DISCUSIONES

En la presente investigación se buscó determinar la concentración de fenoles totales y la actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay” a diferentes concentraciones (25 ug/mL, 50 ug/mL, 100 ug/mL, 150 ug/mL, 200 ug/mL, 250 ug/mL). Las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl fueron recolectadas en el centro poblado de Anchac-wasi (Huaraca) del distrito de Vinchos de la provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.

Para la obtención del extracto atomizado de wawillay se siguió el protocolo descrito por Nikolai S,<sup>27</sup> el cual presentó un color marrón claro, olor *sui géneris*, sabor amargo, aspecto resinoso, solubilidad en metanol y poca solubilidad en agua, pH de 6,34; humedad de 6,70% y cenizas de 5,21%; tal como se muestra en la Tabla 1. Según Kuklinski<sup>21</sup>, la solubilidad depende de la forma en que se encuentran: aglicones libres: son insolubles en agua, poco solubles en mezclas hidroalcohólicas y solubles en disolventes orgánicos ya sean polares o apolares. Heterósidos: son solubles en agua y en mezclas hidroalcohólicas e insolubles en disolventes orgánicos apolares. Así mismo, se obtuvo un extracto atomizado con un porcentaje de rendimiento de 6.8 %, es decir de 875 g de hojas secas se obtuvo 59.5 g de extracto atomizado.

En la Tabla 2, se presentan los compuestos químicos identificados del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay” siendo estos las catequinas, lactonas y/o cumarinas, saponinas, flavonoides, fenoles y/o taninas, quinonas, triterpenos y/o esteroides y azúcares reductores. Según Del Solar,<sup>10</sup> se identificaron los siguientes metabolitos secundario: flavonoides, taninos, triterpenos, esteroides y quinonas en el género *Calceolaria*. De la Cruz,<sup>13</sup> refiere que los flavonoides (presentes en el género *Calceolaria*), como los ácidos fenólicos demuestran fuerte atrapamiento de radicales libres y al mismo

tiempo son capaces de inhibir la formación de estos últimos al enlazarse con iones de metales de transición.

En el presente estudio esta situación es crítica, debido a la higroscopia inherente del extracto atomizado y a la cantidad de extracto añadido. Las medidas utilizadas para evitar estos inconvenientes es adecuar un área de trabajo, controlando el porcentaje de humedad en el medio.

En la Figura 2, se presentan los compuestos fenólicos totales en miligramos de equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" de tres repeticiones de la misma muestra con pesos de 0,1003 g; 0,100 g y 0,100 g de extracto atomizado los cuales presentaron  $16,1 \pm 0,2$  mg EAG/g extracto atomizado;  $15,3 \pm 0,6$  mg EAG/g extracto atomizado;  $16,3 \pm 0,4$  mg EAG/g extracto atomizado respectivamente determinados a partir de la curva de calibración de ácido gálico representada en la Figura 1. Los cuales promedian  $15,9 \pm 0,5$  mg EAG/g extracto atomizado a partir del cual se calculó la cantidad de extracto atomizado para la determinación del porcentaje de actividad antioxidante.

El modo de preparación de las diluciones a partir de las cuales se elaborará curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de compuestos fenólicos totales del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" se realizó de acuerdo a lo descrito por Stintzing F *et. al.*<sup>30</sup>, al igual que las muestras, representadas en los Anexos 8 y Anexo 9.

El método utilizado para determinar la actividad antioxidante fue de decoloración del radical DPPH, que nos da confianza y seguridad en los resultados, ya que es un radical estable y estandarizado.<sup>33</sup> Para determinar la actividad antioxidante se trabajó con la curva de calibración de DPPH (Figura 3) que se elaboró de acuerdo a Sousa C,<sup>31</sup> a las concentraciones 5 ug/mL, 10 ug/mL, 15 ug/mL, 20 ug/mL, 25 ug/mL, 30 ug/mL y 35 ug/mL preparado de acuerdo al Anexo 10.

Para contrastar el porcentaje de la actividad antioxidante se utilizó como estándar ácido gálico que se preparó al igual que el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", a las concentraciones de 25 ug/mL, 50 ug/mL, 100 ug/mL, 150 ug/mL, 200 ug/mL y 250 ug/mL.<sup>31</sup> (Anexo 11 y Anexo 12).

De los resultados obtenidos se muestra en la Figura 4, que las concentraciones de 200 ug/mL tanto del ácido gálico como del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" presentan el mayor porcentaje de

actividad antioxidante ( $94,6 \pm 0,2 \%$  y  $95,2 \pm 0,1 \%$ ) respectivamente. Además que son estadísticamente similares ( $p > 0,05$ ), tal como se observa en la Tabla 4 resultados de la equivalencia estadísticamente significativa del porcentaje de actividad antioxidante entre ácido gálico (estándar) y el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”.

En la tabla 3, se presenta el análisis de varianza ANOVA donde se determinó que hay una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre el porcentaje de actividad antioxidante de una de las concentraciones del ácido gálico (estándar) y uno de los grupos del extracto atomizado de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, dato que fue corroborado con el Test de Tukey (Tabla 4) donde se presentan las comparaciones múltiples entre el porcentaje de actividad antioxidante de las diferentes concentraciones del estándar y del extracto atomizado, demostrando equivalencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre las concentraciones de 50 ug/mL ( $90,3 \pm 3,9 \%$ ), 100 ug/mL ( $93,1 \pm 1,9 \%$ ), 150 ug/mL ( $93,8 \pm 1,3 \%$ ), 200 ug/mL ( $94,6 \pm 0,2 \%$ ) y 250 ug/mL ( $94,4 \pm 0,8 \%$ ) de ácido gálico y las concentraciones de 25 ug/mL ( $95,1 \pm 0,4 \%$ ), 50 ug/mL ( $94,3 \pm 0,4\%$ ), 100 ug/mL ( $94,2 \pm 0,1\%$ ), 150 ug/mL ( $94,7 \pm 0,1 \%$ ), 200 ug/mL ( $95,2 \pm 0,1\%$ ) y 250 ug/mL ( $95,1 \pm 0,1\%$ ) del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, lo que implicaría que la actividad antioxidante es del extracto atomizado a la concentración más baja (25 ug/mL) es equivalente a la concentración con mejor actividad antioxidante del ácido gálico ( $94,6 \pm 0,2 \%$ ).

Por el contrario existe una diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,05$  entre el porcentaje de actividad antioxidante del ácido gálico a la concentración de 25 ug/mL ( $69,2 \pm 1,7 \%$ ) con las otras concentraciones del mismo estándar y las del extracto atomizado de la planta en estudio.

El extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay” contiene metabolitos secundarios que actúan en la neutralización de los radicales libres, como los flavonoides, catequinas y taninos.

Los flavonoides y taninos principalmente presentan actividad antioxidante, pero principalmente a los flavonoides se les atribuye actividad antioxidante de acuerdo a los resultados de Gorduza *et al.*<sup>34</sup> y Kuskoski *et al.*<sup>35</sup>

Estos flavonoides contiene en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, que las confiere una gran capacidad antioxidante,

desempeñando un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis y el cáncer.

Considerando que los radicales libres tienen vida media corta, en el presente estudio se midió la absorbancia a los cinco minutos, en concordancia con los trabajos de Lebeau *et al.*<sup>36</sup>; quienes trabajaron a partir de los cinco minutos. Asimismo, Neyra y Yuri,<sup>37</sup> al evaluar la capacidad antioxidante de la manzana, consideró un tiempo de incubación de ocho minutos dado que en la evaluación antioxidante de un compuesto, no sólo reviste importancia la estructura química y la concentración, sino también el tipo de productos de reacción formados. Los resultados se expresan en porcentaje, observándose una relación directa en la mayoría de los casos entre la concentración y la capacidad antioxidante de la planta en estudio.

Gonzales *et al.*<sup>38</sup>, reportan en su trabajo de investigación la acción fotoprotectora de los taninos condensados de diferentes especies forestales en bacterias (*E. coli*), en los resultados observaron que los taninos de todas las especies vegetales eran capaces de proteger a las bacterias contra el daño de las radiaciones ultravioleta, lo que coincide con una buena actividad antioxidante y antielastasa.

Casanova,<sup>9</sup> evaluó la actividad antioxidante del extracto acuoso liofilizado de *Calceolaria cuneiformes* y reporta una buena actividad con un porcentaje de 86,90% de inhibición del DPPH al tratamiento de 125 ug/mL, al realizar las comparaciones se obtiene que el extracto en estudio tiene un mejor efecto antioxidante, por tanto podemos asumir que el contenido de metabolitos secundarios es mucho mayor.



## VI. CONCLUSIONES

1. El extracto atomizado de la hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" tiene color marrón claro, olor *sui generis*, sabor amargo, aspecto resinoso, poco soluble en agua, bastante soluble en metanol, pH ácido de 6,34; humedad de 6,70 % y 5,21 % de cenizas totales. Los metabolitos secundarios identificados en el tamizaje fitoquímico del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" fueron: catequinas, lactonas, cumarinas, saponinas, flavonoides, taninos, quinonas, triterpenos, esteroides y azúcares reductores.
2. El extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", contiene compuestos fenólicos en promedio  $15,9 \pm 0,5$ mg de EAG/g de extracto atomizado.
3. Se determinó que el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" presenta elevada actividad antioxidante, siendo la mayor de  $95,2 \pm 0,1$  % a la concentración de 200 ug/mL siendo esta estadísticamente similar al porcentaje de actividad antioxidante del ácido gálico.



## VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar el aislamiento de los metabolitos que se encuentran presentes en el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", responsables de la actividad antioxidante.
2. Realizar estudios clínicos y farmacológicos para evaluar la eficacia y seguridad del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl. "wawillay".



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Villar del Fresno M. Farmacognosia General España: Editorial Síntesis S.A.; 1999.
2. Organización Mundial de la Salud. Buenas Prácticas Agrícolas y de Recolección de Plantas Medicinales. OMS , editor. Ginebra: Directrices de un Grupo Científico de la OMS.
3. Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. Life Science. 2006.
4. Naczki M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and análisis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2006.
5. García Alonso M, De Palcual Teresa S, Santos Buelga C, Rivas Gonzalo JC. Evaluation of the antioxidant properties of fruit. Food Chemistry. 2004.
6. Arts ICW, Hollman PCH. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. American Journal of Clinical Nutrition. 2005.
7. Carratú B, Sanzini E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. Ist. Super Sanita; 2005.
8. Cornejo V. Las plantas medicinales y su correcta utilización Ayacucho-Perú: Facultad de Ciencias Biológicas UNSCH; 2003.
9. Casanova G. Actividad antioxidante y antiulcerosa del extracto acuoso liofilizado de *Calceolaria cuneiformis* RLP Subsp. *Cuneiformes* "ayapa zapatum". [tesis]. UNSCH, Ayacucho; 2004.
10. Del Solar C. Actividad antioxidante de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". [tesis]. Ayacucho: UNSCH; 2012.
11. Romero M, et al. Aspectos Botánicos, Fitoquímico, Antibacteriano y producción del Género *Calceolaria* en la provincia de Huamanga-Ayacucho. ; 2009.
12. Harty M, et al. Flavonoids isolated from *Calceolaria chelidonioides* with antioxidant activity. TCDJPPS. [artículo en internet] 2010. [acceso agosto 2012];1(1): 4-7..
13. De la Cruz. Actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de

- Calceolaria rupestris "romero". [tesis]. Ayacucho: UNSCH; 2012.
14. Goyti L. Estudio químico y farmacológico de un extracto activo de Buddleje. globosa hope, budlejaceae, "matico" y diseño de la metodología analítica. Revista en internet (acceso Agosto. del 2015) disponible en: repositorio.uchile.cl/handle/2250/105643. Universidad de Chile. Santiago de Chile.: Departamento de química farmacológica y toxicológica, Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas; 2007.
  15. Molau U. Flora Neotropica. Monograph N°47 Scrophulariaceae. Part.1 Calceolariaceae. New York –USA: The New York Botanical Garden; 1988.
  16. Molau U. Two new species of Calceolaria (Scrophulariaceae) from the Tropical Andes. In.; 2003. p. Novon 13:101-103.
  17. Aedes. Estudio de la biodiversidad vegetal y animal, cuenca de Cotahuasi: flora medicinal La CPd, Consejo Provincial de la Unión STIU, editors. Arequipa-Perú.; 1998.
  18. Silva P, Chamy M, Piovano M, Garbarino G. Diterpenoids from Calceolaria petiolaris Phytochemistry. 1993: p. 449 - 451.
  19. Pérez R. Actividad antitumorativa del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de Calceolaria engleriana Kraenzl "wawillay". [tesis]. Ayacucho: UNSCH; 2012.
  20. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica: Métodos de estudio de productos naturales Lima: Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
  21. Kuklinski C. Farmacognosía. 1st ed. España: Omega; 2000.
  22. Del Castillo J. Actividad hipoglucemiante del extracto liofilizado de Calceolaria engleriana Subsp. Lutea Molau. [tesis]. Ayacucho-Perú: UNSCH; 2002.
  23. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales Hanaba UdL, editor. La Habana: Instituto de Farmacia y Alimentos; 2000.
  24. Fullerton E, Martin E. Farmacia Práctica de Remington Mexico: Unión Tipográfica Editorial Hispano América; 1953.
  25. Venereo J. Biblioteca Virtual en Salud de Cuba. [Online].; 2002 [cited 2017 05 10. Available from: [www.sld.cu/revistas/mil/vol31\\_2\\_02/MIL09202.pdf](http://www.sld.cu/revistas/mil/vol31_2_02/MIL09202.pdf).
  26. Alomar M. SOARME: Sociedad Argentina de Medicina Estética. [Online].;

- 2016 [cited 2017 05 10. Available from: <https://www.soarme.com/archivos/1324143195.pdf>.
27. Sharapin, Nikolai. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. CYTED, Convenio Andrés Bello. 2000; Volumen 78.
  28. Paniagua J. Formulación y evaluación de la actividad antiinflamatoria de la crema y gel elaborado a base de extracto atomizado de la corteza de la *Uncaria tomentosa* (Willd) OC. "uña de gato". [Tesis]. Ayacucho: UNSCH; 2008.
  29. Miranda M. Métodos de análisis de drogas y extractos. La Habana - Cuba: Universidad de la Habana: Instituto de Farmacia y Alimentos; 2002.
  30. Stintzing, F et al. Estudio de la actividad antioxidante de los jugos de Guanabana (*Annona muricata*) cultivada en Nayarit. [Online].; 2005 [cited 2017 05 09].
  31. Sousa Cea. Scielo Brasil. [Online].; 2007 [cited 2017 05 09. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021> .
  32. Hernández R. Fernández C. Baptista L. Metodología de la Investigación Científica. 4th ed. México: McGraw-HillInteramericana,; 2006.
  33. Szabo, M; Iditoiu, C; Chambre, D; Lupea , A. Improved DPPH Determination for Antioxidant Activity Spectrophotometric Assay. In.; 2007. p. Pap. 61 (3):214-216.
  34. Gorduza, V; Tarabasanu , C; Gorduza , A; Cernatescu, C; Rusu, M. Structure-reactivity relationships of antioxidant flavonoides. Ovidius University Annals of Chemistry. 2000; 11 (1): (56-59).
  35. Kuskoski, E; Asuero , A; Troncoso, A; Manzini-Filho, J; Fett, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar la actividad antioxidante de pulpa de frutas. Ciencia Tecnología Alimentaria. 2005; 25 (4)(726-732).
  36. Lebeau, J; Furman, C; Bernier, JL; Duriez, P; Teissier, E; Cotelle. Antioxidants properties of di-terbutylhydroxylated flavonoids. Freerad. Biol Med. 2000; 29 (9) (900-912).
  37. Neira , A; Yuri, J. El valor nutritivo de la fruta. Boletín Técnico POMACEAS. Universidad de Talca. 2004; 4(4).
  38. Gonzales , P; Peña , M; Sánchez, R; Santana, L. Taninos de diferentes especies vegetales en la prevención del foto envejecimiento. Revista Cubana

Invest Biomed. 2001; 1(1).



## **IX. ANEXOS**

**Anexo 1.** Certificado de identificación de la *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017.



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

**C E R T I F I C A**


Que el Bach. en Farmacia y Bioquímica, **Sr. William Augusto, ALMEIDA RODAS**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	SCROPHULARIALES
FAMILIA	:	SCROPHULARIACEAE
GENERO	:	Calceolaria
ESPECIE	:	<b><i>Calceolaria engleriana</i>. Kraenzl</b>
N.V.	:	"wawillay"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

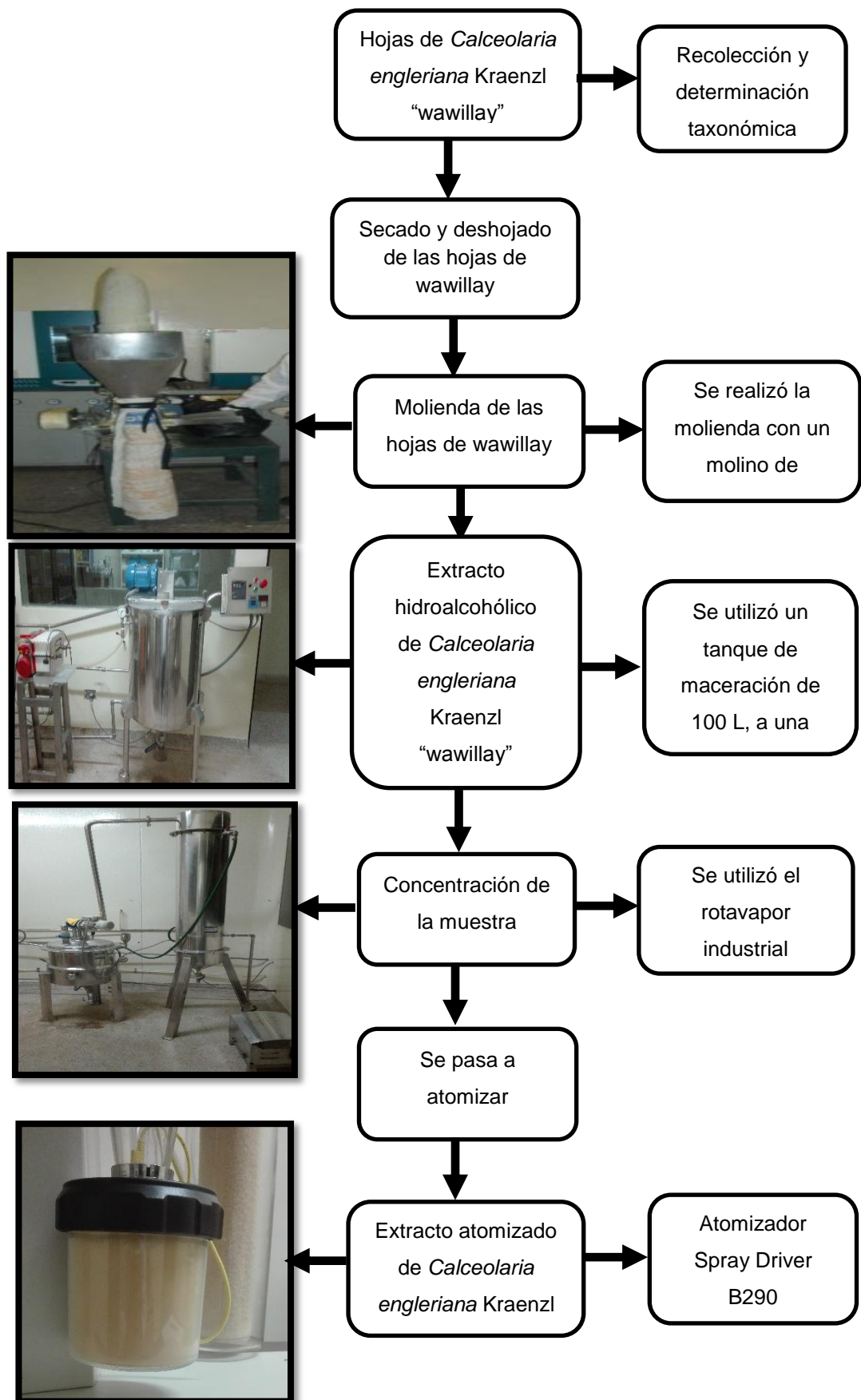
Ayacucho, 21 de Noviembre del 2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERBARIUM HUAMANGENSIS  
  
Biga. Laura Aucasime Medina  
JEFE

**Anexo 2.** *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", que crecen en zonas áridas, del centro poblado de Waraca anexo Anchachuasi provincia de Vinchos del departamento de Ayacucho 2017.



**Anexo 3.** Procedimientos para la obtención del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017.



**Anexo 4.** Concentración del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" realizado en el Laboratorio de Control de Calidad de Farmacia y Bioquímica, Ayacucho 2017.



**Anexo 5.** Recojo del concentrado del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017.



**Anexo 6.** Fotografía del atomizador Spray Driver B290 realizando el proceso de atomización del concentrado de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" en el Centro de Desarrollo de Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos, Ayacucho 2017.

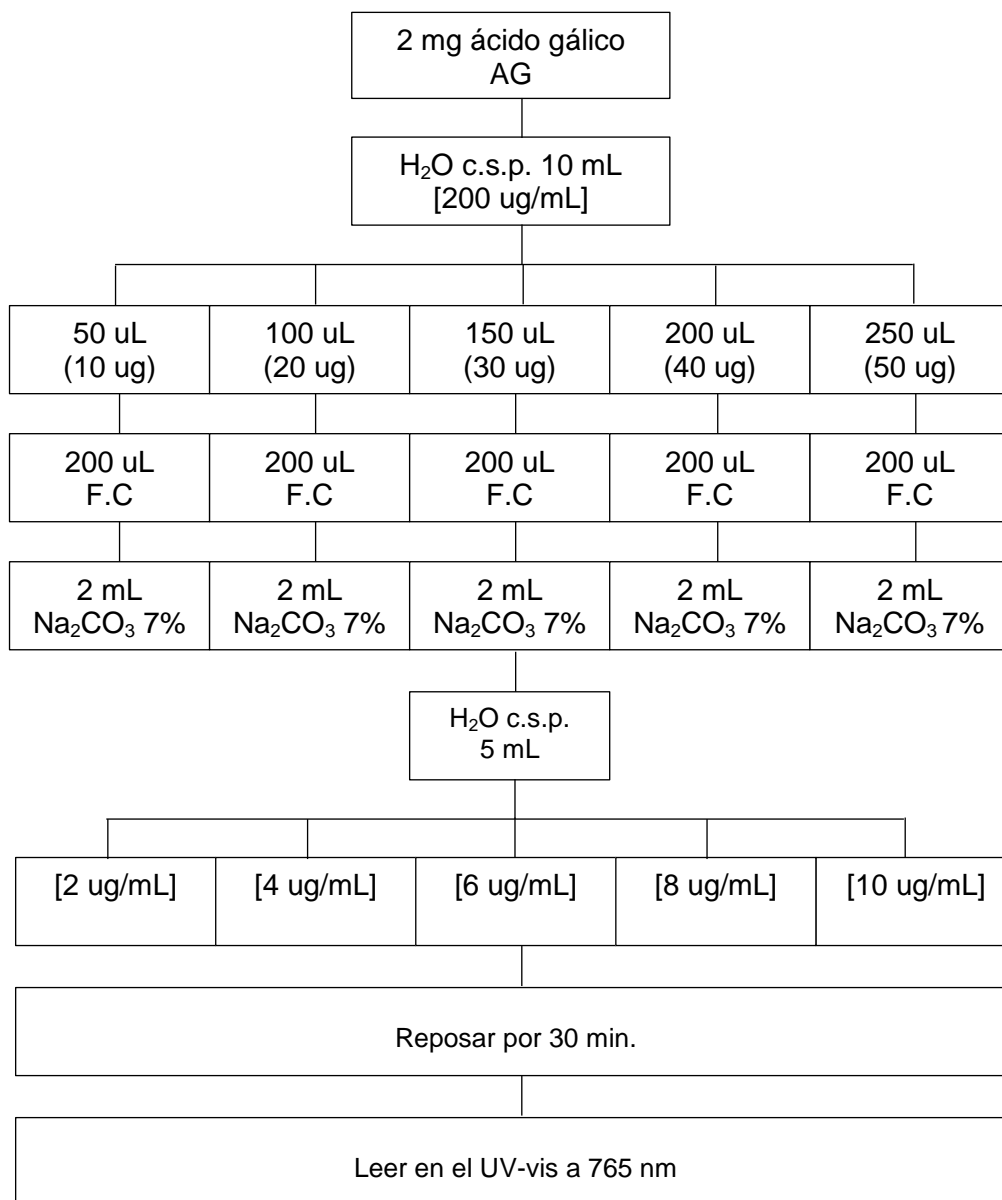


**Anexo 7.** Tamizaje fitoquímico del extracto atomizado de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Ayacucho 2017.



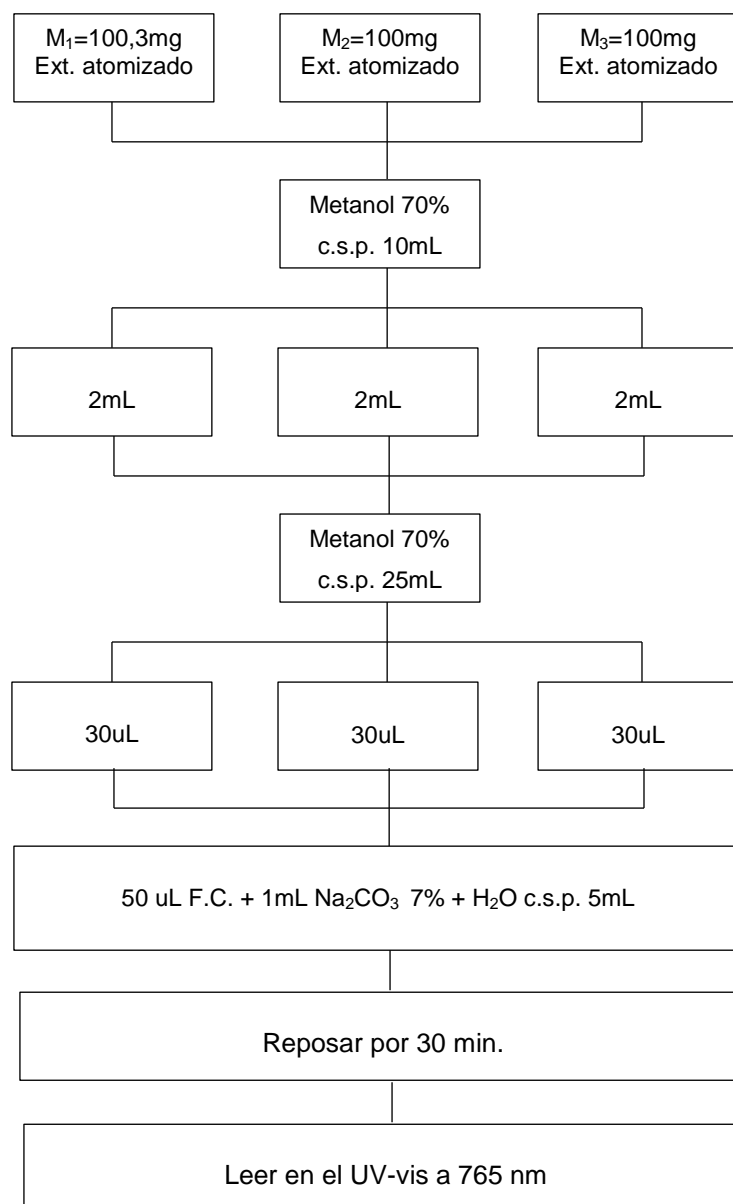


**Anexo 8.** Flujoograma de la preparación de las disoluciones a partir de las cuales se elaborará curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de compuestos fenólicos totales del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, Ayacucho 2017.



F.C. Folin Ciocalteu 1:6 (F.C:H<sub>2</sub>O)

**Anexo 9.** Flujograma de la preparación de la muestra para la cuantificación de compuestos fenólicos totales del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, Ayacucho 2017.

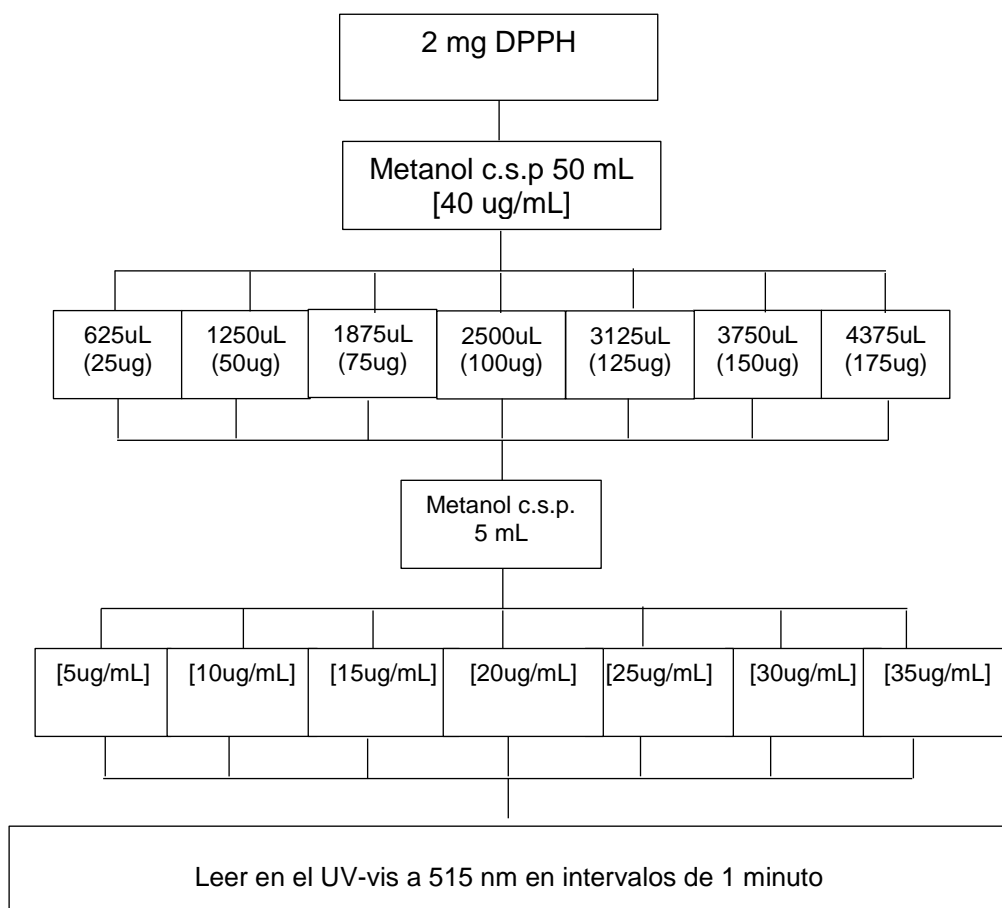


M<sub>1</sub> = M<sub>2</sub> = M<sub>3</sub>: Extraxto atomizado de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”

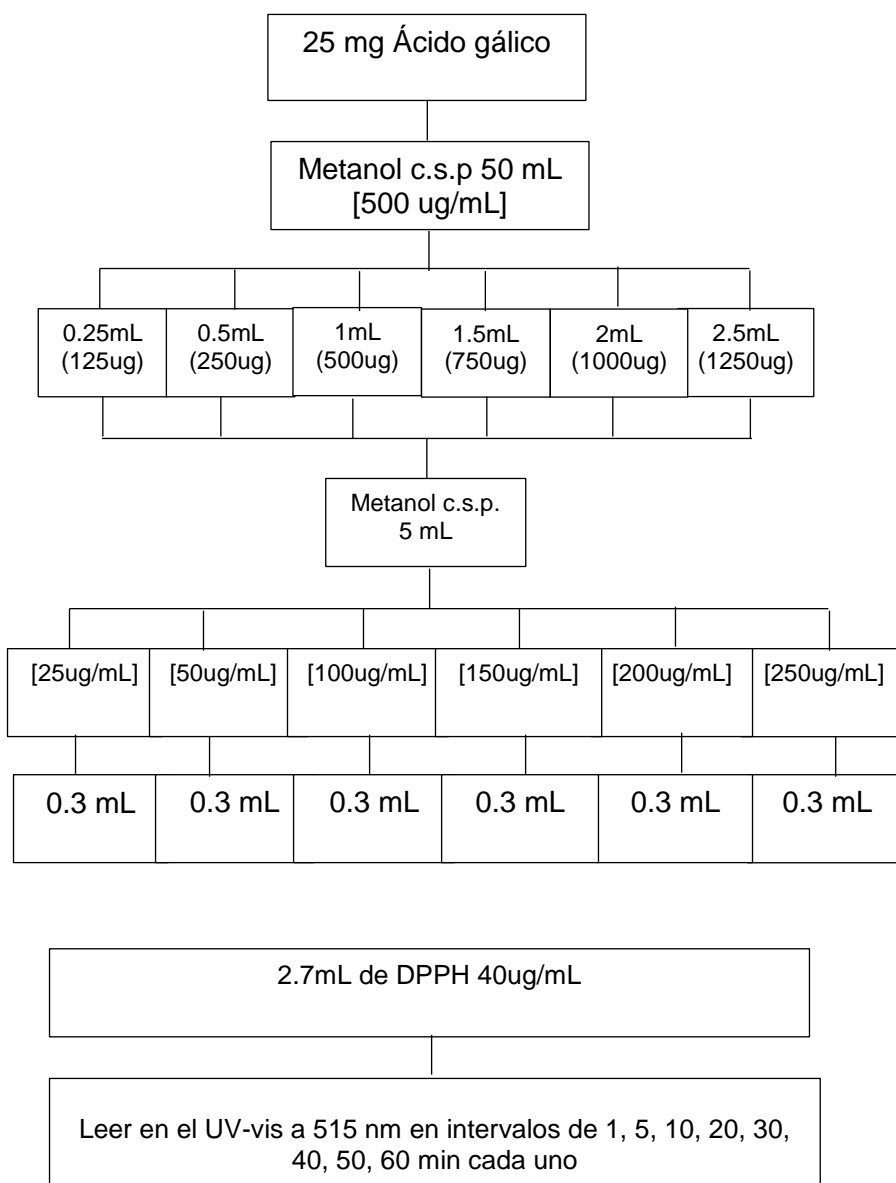
F.C. Folin Ciocalteu 1:6 (F.C:H<sub>2</sub>O)

Blanco: 50 uL F.C. + 1mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7% + H<sub>2</sub>O c.s.p. 5mL

**Anexo 10.** Flujograma de la preparación de las disoluciones a partir de las cuales se elaborará curva de calibración de DPPH para la determinación del porcentaje de actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017.

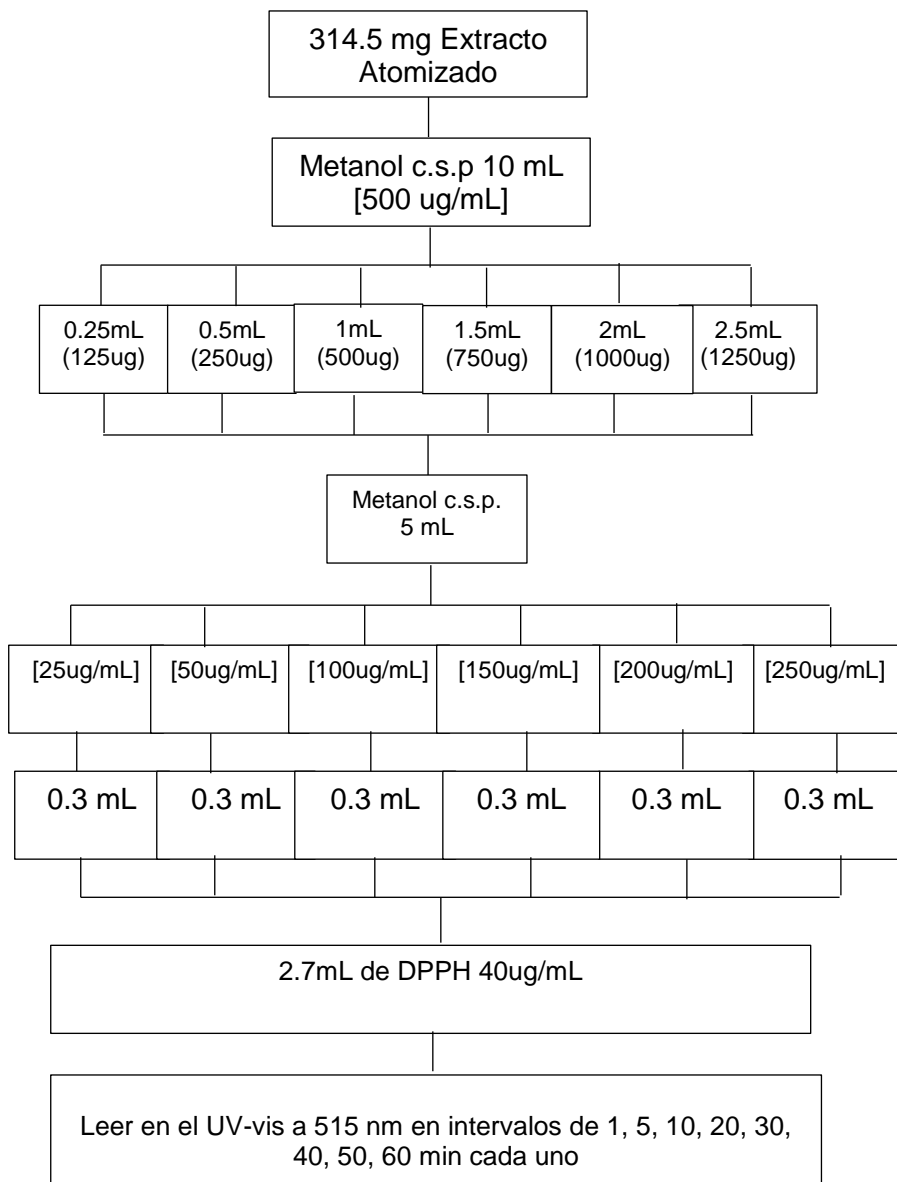


**Anexo 11.** Flujograma de la preparación de ácido gálico para la determinación del porcentaje de actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, Ayacucho 2017.



Blanco: 0.3 mL ac. gálico + 2.7mL metanol

**Anexo 12.** Flujograma de la preparación de la muestra para la determinación del porcentaje de actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”, Ayacucho 2017.



Blanco: 0.3 mL extracto atomizado + 2.7mL metanol

**Anexo 13.** Datos descriptivos del porcentaje de actividad antioxidante del ácido gálico y el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Ayacucho 2017.

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media			
					Límite inferior	Límite superior	Mínimo	Máximo
Ácido gálico [25ug/mL]	8	69,23738	4,701718	1,662308	65,30664	73,16811	58,486	72,907
Ácido gálico [50ug/mL]	8	90,30600	11,121090	3,931899	81,00854	99,60346	63,303	95,183
Ácido gálico [100ug/mL]	8	93,09038	5,272687	1,864176	88,68230	97,49845	80,046	95,155
Ácido gálico [150ug/mL]	8	93,77850	3,708344	1,311097	90,67825	96,87875	84,604	95,183
Ácido gálico [200ug/mL]	8	94,64200	,583190	,206189	94,15444	95,12956	93,205	94,925
Ácido gálico [250ug/mL]	8	94,43775	,212302	,075060	94,26026	94,61524	94,008	94,782
Extracto atomizado [25ug/mL]	8	95,06837	,107325	,037945	94,97865	95,15810	94,925	95,212
Extracto atomizado [50ug/mL]	8	94,27663	,106081	,037505	94,18794	94,36531	94,123	94,467
Extracto atomizado [100ug/mL]	8	94,24075	,214236	,075744	94,06164	94,41986	94,065	94,581
Extracto atomizado [150ug/mL]	8	94,64950	,152524	,053925	94,52199	94,77701	94,495	94,983
Extracto atomizado [200ug/mL]	8	95,16888	,164574	,058186	95,03129	95,30646	95,011	95,528
Extracto atomizado [250ug/mL]	8	93,82175	,252935	,089426	93,61029	94,03321	93,607	94,323
Total	96	91,89316	7,907686	,807075	90,29091	93,49540	58,486	95,528

## Anexo 14. Matriz de consistencia

**TÍTULO:** Fenoles totales y actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017.

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEORICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
Fenoles totales y actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017.	¿Cuál será la concentración de fenoles totales y la actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl?	<p><b>OBJETIVO GENERAL:</b> Determinar la concentración de fenoles totales y la actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "Wawillay".</p> <p><b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Evaluar los parámetros fisicoquímicos del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay".</li> <li>- Cuantificar la concentración de fenoles totales del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay".</li> <li>- Evaluar la actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay".</li> </ul>	<p><b>Descripción botánica de la especie <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl.</b> Sub arbusto erecto con ramas rojizo marrones poco ramificado, con inflorescencia en cimas terminales multiflorales y parte distales de las ramas finamente tomentosa, pelos ascendentes, hojas herbáceas o subcoriáceas, lanceoladas (raramente ovado estrechamente elíptica), aguda cuneada o redondeada en la base.</p> <p><b>RADICALES LIBRES</b> Un radical libre (RL) es cualquier especie química ya sea atómica o molecular, capaz de existir independientemente y que contiene uno o más electrones desapareados en el orbital más externo. (Ramón , 1993)</p> <p><b>ANTIOXIDANTES</b> Son sustancias cuya acción consiste en inhibir las tasas de oxidación de los nocivos radicales libres (disminuyen las defensas, producen daño celular con la posibilidad de producir cáncer, aterosclerosis y envejecimiento). (Lehninger, 1995).</p>	El extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay" posee una elevada concentración de fenoles totales y actividad antioxidante.	<p><b>VARIABLE INDEPENDIENTE:</b> Concentración del extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay".</p> <p><b>INDICADORES:</b> Concentraciones (µg/mL)</p> <p><b>VARIABLE DEPENDIENTE:</b> Actividad antioxidante.</p> <p><b>Indicadores:</b> Porcentaje (%) de actividad antioxidante.</p> <p><b>RELACIÓN ENTRE VARIABLES.</b> El extracto atomizado de las hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", a diferentes concentraciones muestran actividad antioxidante.</p>	<p><b>POBLACIÓN:</b> Hojas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay", que crecen en zonas áridas, del centro poblado de Waraca anexo Anchachuasi provincia de Vinchos del departamento de Ayacucho.</p> <p><b>MUESTRA:</b> 2 Kg de hojas desecadas de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl, recolectadas durante el mes de octubre a partir de los cuales se realizará el extracto hidroalcohólico, siguiendo las recomendaciones establecidas para estos casos.</p> <p><b>DISEÑO METODOLÓGICO:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Se recolectará y se secará la muestra de <i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl "wawillay"</li> <li>- La obtención del extracto hidroalcohólico de la muestra se hará con etanol de 70°.</li> <li>- La concentración de la muestra se hará a 60°C y una presión de -400 Pa.</li> <li>- Se obtendrá el extracto atomizado de la muestra con el atomizador Mini Spray Dryer B.290.</li> <li>- Se procederá a evaluar los parámetros fisicoquímicos del extracto atomizado.</li> <li>- Determinar los fenoles totales usando el método de Folin-Ciocalteu.</li> <li>- El porcentaje de actividad antioxidante se determinará por el método de DPPH por espectrofotometría.</li> <li>- Análisis de datos: ANOVA y Test de Tukey.</li> </ul>