

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA Y  
BIOQUÍMICA**



**Actividad antioxidante del extracto atomizado de las  
hojas de *Calceolaria rupestris* "romero", Ayacucho -  
2012.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICA**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. DE LA CRUZ PALOMINO ANA MARIA**

**AYACUCHO – PERÚ**

**2013**

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D.N° 094 – 13 – UNSCH – FCB – D

Bach. ANA MARÍA DE LA CRUZ PALOMINO

En la ciudad de Ayacucho a los 18 días del mes de Julio del año dos mil trece, en el auditorium de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH, siendo las cuatro de la tarde los miembros del jurado calificador, bajo la presidencia del Dr. Segundo Tomás Castro Carranza e integrado por los siguientes docentes: Mg. César Magallanes Magallanes, Mg. Jesús De La Cruz Arango, Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo y Mg. Marco Aronés Jara (asesor) actuando como secretario. Docente encargado el Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo, para recepcionar la sustentación de la Tesis Titulada Actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero", Ayacucho 2012. Presentado por la bachiller de Farmacia y Bioquímica Ana María De La Cruz Palomino. Quien pretende obtener el Título profesional de Químico Farmacéutica.

Como primer acto el presidente dió las recomendaciones a la sustentante para la exposición correspondiente el cual no debe ser mayor a los cuarenta y cinco minutos, culminado la exposición el presidente solicitó a los miembros del jurado calificador su participación para realizar sus observaciones, aclaraciones y preguntas que crean por conveniente para realizar la evaluación los miembros del jurado calificador participaron la evaluación los miembros del jurado calificador participaron en el siguiente orden: Mg. César Magallanes Magallanes, Mg. Jesús De La Cruz Arango, Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo y finalmente el Asesor Mg. Marco Aronés Jara y el presidente Dr. Segundo Tomás Castro Carranza.

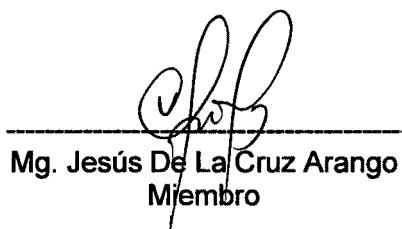
Culminado la exposición y la fase de participación de los miembros del jurado el presidente invitó a la sustentante y al público asistente abandonar

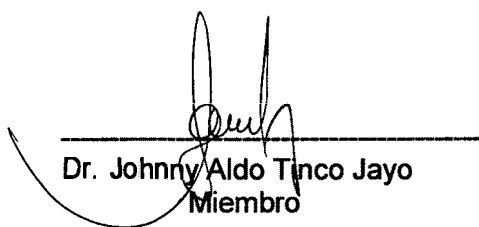
momentáneamente el auditorium para que los miembros del jurado puedan deliberar sus calificaciones correspondientes de lo deliberado se obtuvo lo siguiente:

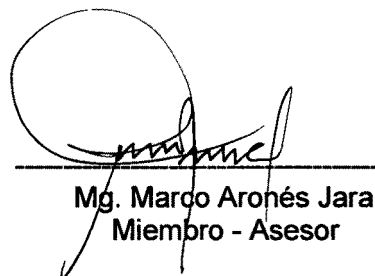
Jurado Calificador	Exposición	Rpta a Preguntas	Promedio
Mg. César Magallanes Magallanes	16	16	16
Mg. Jesús De La Cruz Arango	16	17	17
Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo	17	17	17
		Promedio	17

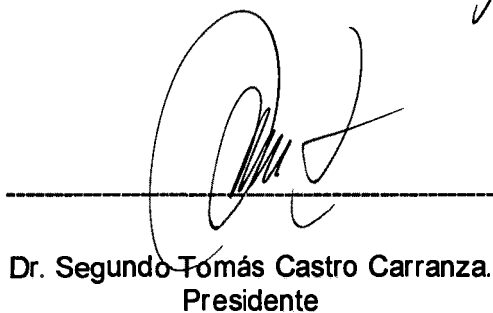
De la evaluación realizada la sustentante obtuvo la nota promedio de Diecisiete de lo cual dan Fe los miembros del jurado calificador estampando su firma al pie del presente.

  
Mg. César Magallanes Magallanes  
Miembro

  
Mg. Jesús De La Cruz Arango  
Miembro

  
Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo  
Miembro

  
Mg. Marco Aronés Jara  
Miembro - Asesor

  
Dr. Segundo Tomás Castro Carranza.  
Presidente

**DEDICATORIA**

A mis padres, Eulogio y Adela.

A mis hermanas, Johanna y Adela.



## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga forjador de excelentes profesionales al servicio de la sociedad y del país.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, a la Escuela de Formación 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 y orientaciones durante mi formación profesional.

Un reconocimiento especial a mi asesor Mg. Marco Rolando Aronés Jara, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de esta tesis.

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
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. <i>Calceolaria rupestris</i> "romero"	4
2.3. Radicales libres	5
2.4. Antioxidantes	7
III. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1. Lugar de trabajo de investigación	10
3.2. Población	10
3.3. Muestra	10
3.4. Sistema de muestreo	10
3.5. Tipo de Investigación	11
3.6. Métodos para la recolección de datos	11
3.6.1. Recolección y desecación de las hoja	11
3.6.2. Obtención del extracto hidroalcohólico atomizado	11
3.6.3. Identificación de compuestos químicos	12
3.6.4. Evaluación de los parámetros fisicoquímicos	12
3.6.5. Determinación de la actividad antioxidante	14
3.7. Análisis de datos	16
IV. RESULTADOS	17
V. DISCUSIÓN	24
VI. CONCLUSIONES	29
VII. RECOMENDACIONES	30
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXOS	

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en el extracto atomizado	18
Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos del extracto atomizado	19

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Porcentaje de captación de radicales libres según las concentraciones de 300 ug/mL del extracto atomizado	20
Figura 2. Porcentaje de captación de radicales libres según las concentraciones de 600 ug/mL del extracto atomizado	21
Figura 3. Porcentaje de captación de radicales libres según las concentraciones de 900 ug/mL del extracto atomizado	22
Figura 4. Porcentaje de captación de radicales libres según las diferentes concentraciones del extracto atomizado	23

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Hojas y Flores de <i>Calceolaria rupestris</i>	35
Anexo 2. Constancia de la clasificación taxonómica	36
Anexo 3. Flujograma de los procesos para la obtención del extracto hidroalcohólico atomizado	37
Anexo 4. Flujograma de identificación de metabolitos secundarios	38
Anexo 5. Expresiones cualitativas de la solubilidad de la Farmacopea Europea (1993)	39
Anexo 6. Flujograma de la determinación de la actividad antioxidante del extracto atomizado	40
Anexo 7. Datos descriptivos de la actividad antioxidante	41
Anexo 8. Prueba de Duncan de las concentraciones de 300 ug/mL	42
Anexo 9. Prueba de Duncan de las concentraciones de 600 ug/mL	43
Anexo 10. Prueba de Duncan de las concentraciones de 900 ug/ml	44
Anexo 11. Análisis de varianza de la actividad antioxidante	45
Anexo 12. Resultados del análisis de comparaciones múltiples de la prueba de Duncan	46
Anexo 13. Análisis factorial de la actividad antioxidante	47
Anexo 14. Matriz de consistencia	48

## RESUMEN

Los radicales libres están asociados a muchos procesos patológicos y enfermedades agudas y crónicas, es por eso que se justifica la búsqueda de antioxidantes. *Calceolaria rupestris* es una especie medicinal de uso tradicional que contiene muchos metabolitos secundarios con diversas propiedades biológicas. Por eso, se planteó como objetivo evaluar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero"; realizado en los ambientes del Área de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. La muestra fue colectada en la comunidad de Huaraca, anexo del distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, región de Ayacucho. Se obtuvo el extracto hidroalcohólico y fue concentrado por atomización, se determinaron los parámetros físico – químicos del atomizado, como pH, composición química, porcentaje de humedad, porcentaje de cenizas, porcentaje de rendimiento, análisis organoléptico. La actividad antioxidante se determinó por el método de captación del radical libre DPPH, evaluándose a las concentraciones de 300 ug/ml, 600 ug/ml y 900 ug/ml, a diluciones de 1, 25, 50 y 100 ug/ml de cada uno de ellos respectivamente, expresándose los resultados como porcentaje de inhibición. El extracto hidroalcohólico atomizado presentó color marrón claro, olor *sui generis*, sabor amargo, aspecto resinoso, soluble en alcohol etílico y poco soluble en agua, pH 6,60, humedad 6.65%, cenizas 5,19%; con un rendimiento de 9.37%. Los compuestos químicos presentes son flavonoides, taninos, fenoles, azúcares reductores, catequinas, quinonas, triterpenos y esteroides. Los mayores porcentaje de inhibición se obtuvieron a las diluciones de 100 ug/ml, 50 ug/ml y 25 ug/ml de la concentración de 300 ug/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 ug/ml a las diluciones de 100 ug/ml y 25 ug/ml con un  $98,0 \pm 0,37$  y  $97,0 \pm 0,28$  de porcentaje de inhibición respectivamente. No se hallaron diferencias estadísticas entre ellos. Se concluye que a las concentraciones ensayadas del extracto hidroalcohólico atomizado tienen la misma actividad antioxidante.

Palabras clave: Actividad antioxidante, DPPH, extracto atomizado, *Calceolaria rupestris*.

## I. INTRODUCCIÓN

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>1</sup>

Actualmente los antioxidantes naturales son usados en la industria alimentaria y en la atención de la salud para prevenir, aliviar y/o curar procesos degenerativos, como consecuencia de la presencia de radicales libres en nuestro organismo. En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático, el proceso debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante.<sup>2</sup>

Los antioxidantes son un grupo de moléculas reconocida por su capacidad para neutralizar los radicales libres, estas sustancias han surgido como una alternativa para combatir las deficiencias asociadas al estrés oxidativo.<sup>3</sup>

Con esta investigación tratamos de aportar en algo el uso del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero".

*Calceolaria rupestris* "romero". Es una especie que pertenece al género *Calceolaria* los cuales presentan metabolitos secundarios como Flavonoides, Taninos, que realizan la actividad antioxidante.<sup>4, 5</sup>

Los flavonoides como los ácidos fenólicos han demostrado ser fuertes atrapadores de radicales libres y al mismo tiempo son capaces de inhibir la formación de estos últimos al enlazarse con iones de metales de transición.<sup>6</sup>

Las investigaciones sobre el estudio de plantas medicinales son reconocidas y de gran importancia para la Organización Mundial de la Salud. Por lo tanto el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero" sirva como una alternativa medicamentosa. Para lo cual se plantearon los siguientes objetivos:

**Objetivo general:**

Evaluar la actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero", Ayacucho 2012.

**Objetivos específicos:**

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero".
- Determinar los parámetros físico - químicos del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero".
- Determinar la actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero".



## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes

Casanova,<sup>7</sup> 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 ug/ml.

Del Solar,<sup>8</sup> estudio 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 ug/ml presentando mayor porcentaje de inhibición de radicales libres ( $99,46 \pm 0,11$ ); respecto a las cremas al 1,0 % y 2,0 % que presentaron porcentajes de  $99,10 \pm 0,46$  % y  $96,45 \pm 0,53$  % respectivamente.

Romero,<sup>9</sup> en un estudio sobre la actividad antioxidante en el cual se utilizó el método de DPPH, se reconoció que el efecto dosis dependiente con las especies *Lepechinia meyeri* con un  $DE_{50}$  de 10,45 ug/ml; *Baccharis tricuniata* con un  $DE_{50}$  de 10,46 ug/ml; *Solanum radicans* con un  $DE_{50}$  de 11,28ug/ml y *Saturaje incana* con un  $DE_{50}$  de 11,78 ug/ml. En comparación con extractos etanólicos de *Columellia obovata* con un  $DE_{50}$  de 28,58 ug/ml; *Equisetum*

*bogotense* con DE<sub>50</sub> de 29,47 ug/ml y *Salvia sagitata* con DE<sub>50</sub> de 30,0 ug/ml (Vitamina C).

Harty,<sup>10</sup> 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<sub>50</sub> en ug/mL= 30,3 ± 1,9; 23,7 ± 2,4 y 18,8 ± 2,1), los flavonoides son bien conocidos antioxidantes y usando el DPPH.

## **2.2 Calceolaria rupestris "romero"**

### **2.2.1 Clasificación taxonómica**

División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Sub clase	:	Asteridae
Orden	:	Scrophulariales
Familia	:	Scrophulariaceae
Género	:	Calceolaria
Especie	:	<i>Calceolaria rupestris</i> Molau.
Nombre vulgar:	:	"romero"

Fuente: Constancia emitida por el Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural. (Anexo 2).

### **2.2.2 Descripción botánica**

Arbusto erecto o ascendente 0,25 – 1,5 m de alto, muy ramificado, partes con inflorescencia distal y pubérulas de deriva o corto hisurte, con pelos glandulares, fasciculada en los laterales con brotes cortos, hojas estrechamente elípticas en línea 10 -25 x 2 - 4 mm, aguda y más o menos mucronulate en el ápice,

atenuadas en la base, superficie superior verde grisáceo oscuro liso suave (pero con el nervio central impresionado), superficie inferior blanco, la nervadura central prominente, venación otro obsoleto; márgenes enteros, revduto; pecíolos 1-3 mm glandular. Inflorescencia compuesta de 2 - 5 paris cimas de 1- 4 flores sobre pedúnculos 0,4 – 1,3 cm de largo; brácteas presentes en cima; pedicelos 0,5 - 1,6 cm; sépalos amarillo verde, ovadas, agudas o subagudas, 3,8 – 6,4 x 1,2 – 3,6 mm en la antesis externamente glandular, internamente glabros. Corola de tipo dos, de color amarillo brillante, sin mancha; labio superior subglobosos, 2 - 4 mm x 3 – 4 mm; labio en forma de U cuando se ve en vista lateral, 13 - 20 x 7 - 10 mm, el saco ascendente. Tipo de estambres once; buff anteras, 3 - 4.8 mm, las tecas bifurcarse o deflexos ligeramente; filamentos de 0,8 – 1,4 mm. Estilo arqueado 1,6– 2,8 mm, glabro o diminutamente glandular - pubérulas proximalmente cápsula ovoide, de 6 - 8 mm de largo, de color marrón, glandular - pubérulas. Filamentos de 0,8 – 1,4 mm, estilo arqueado, 1,6 – 2,8 mm, glabro o diminutamente glandular - pubérulas proximalmente cápsula ovoide, de 6 - 8 mm de largo, de color marrón, glandular – pubérulas.<sup>11</sup>

### **2.2.3 Composición química**

Se ha podido identificar los siguientes metabolitos como: flavonoides, taninos, quinonas de manera abundante y seguidamente triterpenos, esteroides y azúcares reductores.<sup>4' 5</sup>

## **2.3 Radicales libres**

### **a. Actividad química de los radicales libres**

Se llama radical a cualquier especie atómica o molecular que tenga uno o más electrones no apareados y que pueden existir en forma independiente. Se sabe que los electrones de los átomos ocupan regiones en el espacio denominado orbitales, cada uno de los cuales puede contener un máximo de dos.<sup>12</sup>

La mayor parte de oxígeno utilizado por el organismo humano es reducido a agua por la acción del complejo citocromo – oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial.

Sin embargo, el efecto lesivo del oxígeno, formados al sufrir cambios por reducciones univalentes.<sup>13</sup>

Así, tenemos por captación de un electrón, el oxígeno molecular se convierte en un radical con carga negativa el anión superóxido ( $O_2^-$ ). Un segundo producto, el peróxido ( $H_2O_2$ ) aunque no es realmente un radical, pero la captación de un electrón y un protón da lugar a la formación de molécula de agua y aun radical hidroxilo ( $OH^-$ ).

Por otro lado, el oxígeno molecular puede absorber energía y convertirse en una molécula sumamente reactiva, el siguiente de oxígeno ( $O_2^-$ ).<sup>14</sup>

Si se encuentran dos radicales libres pueden unirse sus electrones no emparejados y formar un enlace covalente. Un ejemplo es la reacción muy rápida de  $NO^-$  con  $O_2^-$  para formar un producto no tóxico o peroxinitrito.<sup>14' 15</sup>

#### **b. Radicales libres en el humano**

El organismo humano fabrica también radicales libres ( $OH^-$ ,  $O_2^-$  y el  $NO^-$ ). En efecto el anión superóxido  $O_2^-$  se genera en las células fagocíticas para cumplir una función bactericida. La activación fagocitaria excesiva provoca lesiones en los tejidos, a las que contribuyen los radicales de oxígeno.<sup>12</sup>

El radical oxidrilo ( $OH^-$ ), se considera una molécula tóxica para el organismo y su generación es aparentemente accidental y no forma parte del metabolismo normal puede ser generado por reacción inicial en el  $O_2^-$  y el  $NO^-$  o derivado de reacciones promovidas por  $Fe^{+2}$  y el  $Cu^{++}$  iones metálicos de transición.<sup>12</sup>

## **2.4. Antioxidantes**

Los antioxidantes son un grupo de moléculas reconocida por su capacidad para neutralizar los radicales libres, estas sustancias han surgido como una alternativa para combatir las deficiencias asociadas al estrés oxidativo.<sup>3</sup>

Las sustancias antioxidantes se han clasificado en dos principales sistemas, el sistema enzimático y el sistema no enzimático; también conocido como endógeno y exógeno respectivamente; las cuales pueden actuar tanto en el espacio intracelular como en el extracelular. El primer sistema de defensa corresponde a las enzimas antioxidantes o endógenas, está basado en un complejo enzimático de defensa que puede incluir a la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa, la tioredoxina reductasa y al glutatión reductasa. El segundo sistema de antioxidantes no enzimáticos o exógenos, es un sistema paralelo al primero y especialmente útil cuando el sistema endógeno se satura. Está determinado por una serie de sustancias llamados depuradores o radicales libres. Algunos antioxidantes no enzimáticos son el ácido lipoico, la bilirrubina, los compuestos fenólicos, los flavonoides, la vitamina C, la vitamina E.<sup>6</sup>

### **a. Clasificación de antioxidantes**

Los antioxidantes se clasifican en dos sistemas:

- **Antioxidantes endógenos**

Son los sistemas antioxidantes que se producen dentro del organismo para combatir la acción de los radicales libres. Se clasifican en enzimáticos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa) y no enzimáticos (glutatión, melatonina, estrógenos, ácido úrico, albúmina).<sup>16, 17</sup>

- **Antioxidantes exógenos**

Cuando el sistema endógeno se satura, capturan los radicales libres evitando la reacción en cadena, este proceso se obtiene mediante la dieta. Dentro de éstos antioxidantes encontramos a la vitamina C, vitamina E, carotenoides y compuestos fenólicos.<sup>18</sup>

- b. Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos, son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido al menos un grupo funcional (ésteres, metil-éster). Son productos biosintetizados en las plantas que poseen la característica biológica de ser productos secundarios de su metabolismo. En general son sintetizados por una de dos vías biosintéticas: la ruta del ácido shikímico o la vía del ácido malónico (o por las dos, por ejemplo los flavonoides).<sup>19</sup>

La ruta del ácido malónico, es una fuente importante de fenoles, poco empleada en plantas superiores; la ruta del ácido shikímico, es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de las plantas. A partir de eritrosa – 4 - P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido shikímico y, derivados de este, aminoácidos aromáticos (fenilalanina), la enzima fenilalanina amonio liasa cataliza la formación de ácido cinámico por eliminación de una molécula de amonio de la fenilalanina, este ácido se metaboliza para formar ácidos fenólicos (caféico y ferúlico), cuya principal función es ser precursor de otros derivados más complejos como los flavonoides.<sup>20</sup>

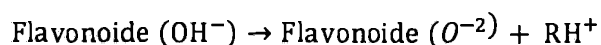
- c. Flavonoides**

Los flavonoides se forman biogénicamente a través de la ruta del Shikimato y del acetato malonato, siendo la chalcona el flavonoide inicialmente formado. Existe una base común que explicaría los efectos farmacológicos de los

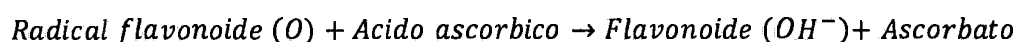
flavonoides, considerándose la actividad antioxidante como la más probable para jugar este papel.

Existen algunas condiciones estructurales que favorecen la actividad antioxidante:

- Agrupamiento O - hidroxilo en el anillo B (la actividad aumenta con el número de hidroxilos sustituidos).
- Doble enlace 2 - 3, en conjugación con una función 4 - oxo del anillo C.
- Presencia adicional de grupos hidroxilos en 3,5 y 7 del núcleo A.
- El concepto básico de la actividad antioxidante de los flavonoides y otros compuestos, comprende una transición redox, mediante el cual la molécula antioxidante dona un electrón o átomo de hidrógeno, equivalente a la donación de un electrón y un hidrógeno al radical libre R. durante el transcurso de esta transferencia de electrones, el carácter radical derivado, como en la siguiente reacción:



El mecanismo inherente a los efectos antioxidante de los flavonoides (al igual que los antioxidantes) deben reunir dos requisitos básicos para ser considerados tales: en primer lugar aun a bajas concentraciones deben proteger los compuestos contra la oxidación o el daño de los radicales, y en segundo lugar el radical flavonoide - aroxil así formado debe ser lo suficientemente estable para que la función antioxidante sea efectivo. La falta de estabilidad que pueda tener el radical aroxilo está en la base del efecto pro oxidante de algunos flavonoides. A su vez puede ser recuperado por otros antioxidantes como el ácido ascórbico.



Esto hace que los flavonoides se muestren más activos y por lo tanto poseen actividad.<sup>21</sup>

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Lugar de trabajo de investigación**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Área de Farmacia en el Laboratorio del Centro de Desarrollo, Análisis y Control de Calidad de Medicamentos y Fitomedicamentos (CEDACMEF) "Marco Antonio Garrido Malo" de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de junio del 2012 a marzo del 2013.

#### **3.2 Población**

*Calceolaria rupestris* "romero", del centro poblado de Anchac - Wasi (Huaraca) del distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, ubicado a una altura de 3 129 m.s.n.m.

#### **3.3 Muestra**

Se utilizó cinco kg de hojas seleccionadas de *Calceolaria rupestris* "romero", recolectadas durante el mes de junio del 2012, posteriormente se certificó la especie en el Herbario San Marcos (UNMSM) del Museo de Historia Natural, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Anexo 2).

#### **3.4 Sistema de muestreo**

Libre por conveniencia



### **3.5 Tipo de Investigación**

Básica

### **3.6 Métodos para la recolección de datos**

#### **3.6.1. Recolección y desecación de las hojas**

La muestra de *Calceolaria rupestris* "romero" se recolectó en estado de madurez en horas de la mañana y transportada en bolsas a los laboratorios de la Escuela de Farmacia. Para su lavado con hipoclorito de sodio y se secaron a temperatura ambiente, en un lugar con buena ventilación, sombreado en tendeles de papel bond, removiendo el vegetal cada 24 horas para evitar su descomposición, por un periodo de cinco a ocho días según las directrices OMS.<sup>1</sup>

#### **3.6.2. Obtención del extracto hidroalcohólico atomizado**

Luego el secado de la planta se procedió al deshojado de las hojas para ser reducidas de tamaño utilizando el molino de cuchilla y martillo con malla de un cm aprox, hasta obtener un pulverizado uniforme, teniendo cuidado del sobrecalentamiento del molino para evitar la descomposición de algunos constituyentes químicos obteniendo un molido de 965 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>22</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>23</sup>

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.

### **3.6.3. Identificación de compuestos químicos**

La identificación de los diferentes compuestos químicos (metabolitos secundarios) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero" fueron realizadas siguiendo los procedimientos de Miranda y Cuéllar.<sup>23</sup>

### **3.6.4 Evaluación de los parámetros físico - químicos**

Una vez obtenido el extracto atomizado, se evaluaron los parámetros físico - químicos, que a continuación señalamos.<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.

**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>21</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>21</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.

**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, 1l y más de 10 l (Anexo 5).<sup>24</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>25</sup>

**d) Determinación del contenido de humedad**

Se pesó dos g. de la muestra de ensayo con desviación permisible de cinco 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>25</sup>

Cálculo:

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

Dónde:

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 dos g ni más de tres g de la muestra de ensayo, con una desviación permisible de cinco mg en un crisol de porcelana o platino previamente tarado. Se calienta suavemente la muestra de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar y posteriormente incinere 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>25</sup>

Cálculo:

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

Dónde:

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.

### **3.6.5. Determinación de la actividad antioxidante**

Para la búsqueda de agentes antioxidantes de radicales libres se empleó el bioensayo "in vitro" en donde el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo hidratado (DPPH), que en solución metanólica es de color violeta intenso, al ser capturado

por otras sustancias (antioxidantes) pierde su color característico el mismo que es medido por espectrofotómetro.<sup>26</sup>

### **Procedimiento**

- Se preparó una solución metanólica de DPPH de 20 ug/ml.
- Luego se preparó una solución metanólica del extracto hidroalcohólico atomizado a una concentración de 300 ug/ml (solución A).
- El blanco se preparó con metanol agua 2:1 para ajustar el espectrofotómetro a cero.
- El blanco de muestra se preparó con 0.75 ml de muestra (solución A) y 1,5 ml de metanol
- Se preparó el patrón de referencia con 1.5 ml de DPPH y 0.75 ml de agua.
- La muestra, con 0,75 ml de solución A y 1,5 ml de DPPH obteniéndose una solución final de 100 µg/ml.
- Inmediatamente se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos y se realizó la lectura de la absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro.
- Se midió la absorbancia del patrón de referencia y del blanco de la muestra.
- Luego se diluyó la solución A con metanol en una proporción 1:1 para obtener una concentración final de 50 ug/ml, 1:3 para obtener una concentración final de 25 ug/ml, y en una proporción de 1:100 para obtener una concentración final de 1 ug/ml.
- Con las soluciones del extracto hidroalcohólico atomizado a 600 ug/ml y 900 ug/ml se procedió igual que en el caso anterior.

Las diluciones a concentraciones de 1,25, 50 y 100 ug/ml se evaluaron por triplicado.

Posteriormente, con los valores de las absorbancias obtenidas se determino

% de captación de radicales libres (DPPH) mediante la siguiente formula:

$$\%_{\text{(DPPH inhibición)}} = 1 - \left[ \frac{A_2 - A_3}{A_1} \right] \times 100$$

A<sub>1</sub>: Absorbancia del patrón de referencia

A<sub>2</sub>: Absorbancia de la muestra

A<sub>3</sub>: Absorbancia del blanco de la muestra

### **3.7. Análisis de datos**

Los resultados obtenidos de la evaluación fitoquímica, control de calidad fisicoquímica se presentaron en tablas.

Los promedios de la actividad antioxidante obtenidas por el DPPH del extracto atomizado a diferentes concentraciones se presentaron en figuras y se realizó el análisis de varianza para identificar diferencias estadísticamente significativas de las concentraciones evaluados ( $p < 0,05$ ) y comparaciones múltiples del Duncan mediante el programa SPSS versión 19.0.

#### **IV. RESULTADOS**

Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en el extracto atomizado

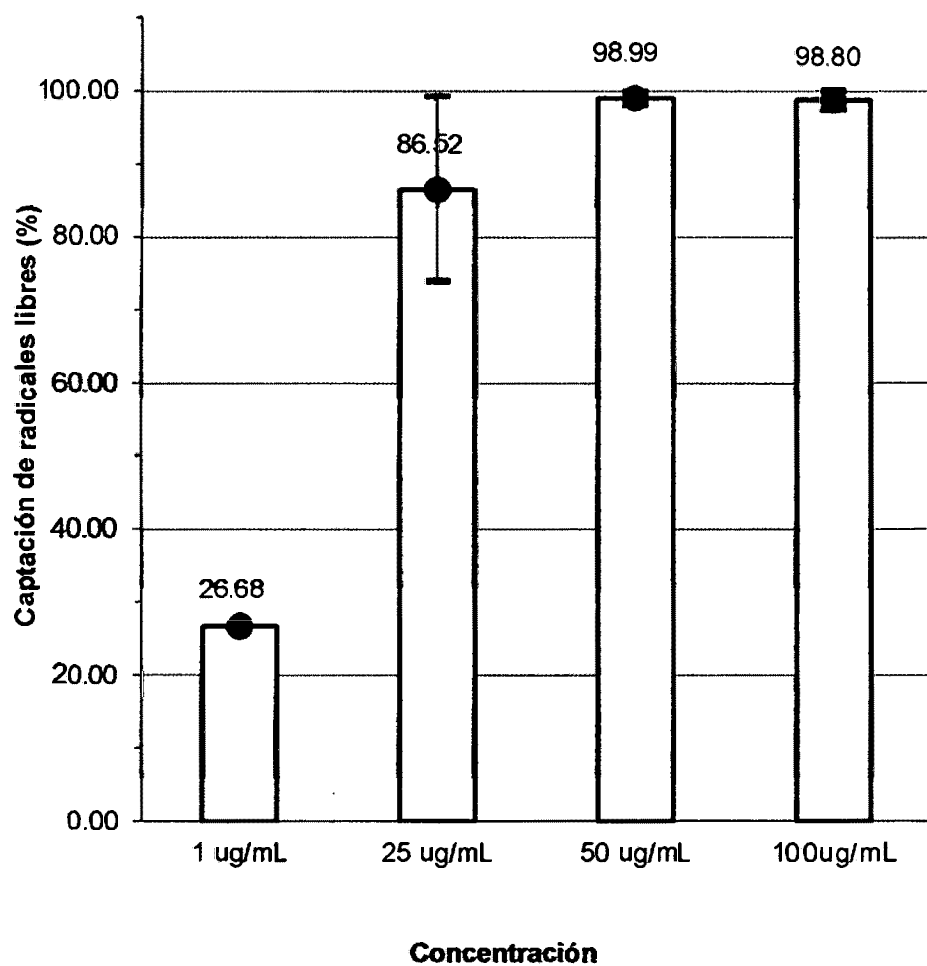
Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Catequinas	catequinas	++	mancha verde carmelita a luz UV
Lactonas y/o Cumarinas	baljet	++	coloración rojiza
Saponinas	espuma	++	formación de espuma
Flavonoides	shinoda	+++	amflica de color amarillo intenso
Fenoles y/o Taninos	cloruro férrico	+++	coloración verde (no son hidrosolubles)
Quinonas	borotrager	++	fase acuosa alcalina color roja
Triterpenos y/o Esteroides	liebermann-burchard	+	coloración verde oscura
Azúcares reductores	fehling	+++	precipitado rojo

Leyenda: (-): Ausente (+): Poco (++) : Bastante (+++): Muy abundante



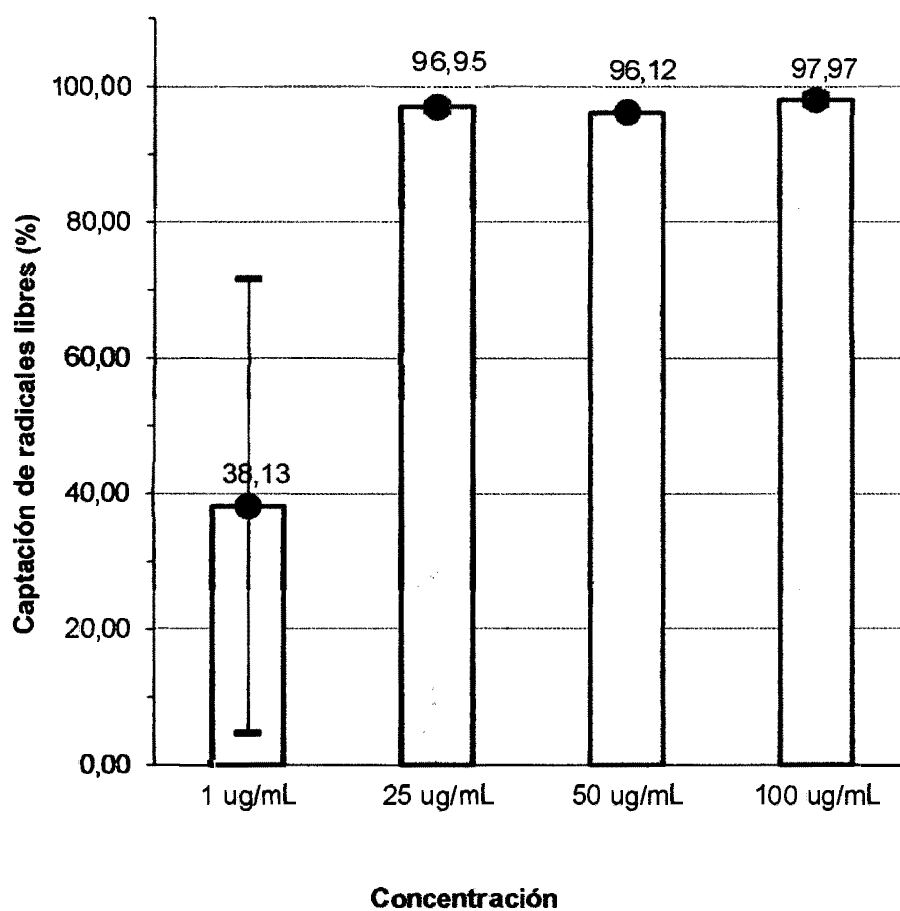
Tabla 2. Parámetros físico - químicos del extracto atomizado

Parámetros	Ensayos	Resultados
Organoléptico	color	marrón claro
	olor	<i>süigéneris</i>
	sabor	amargo
	aspecto	resinoso
Solubilidad	agua	poco soluble
	alcohol	soluble
pH	agua	6,60
Humedad	perdida por desecación	6,65 %
Cenizas	cenizas totales	5,19%



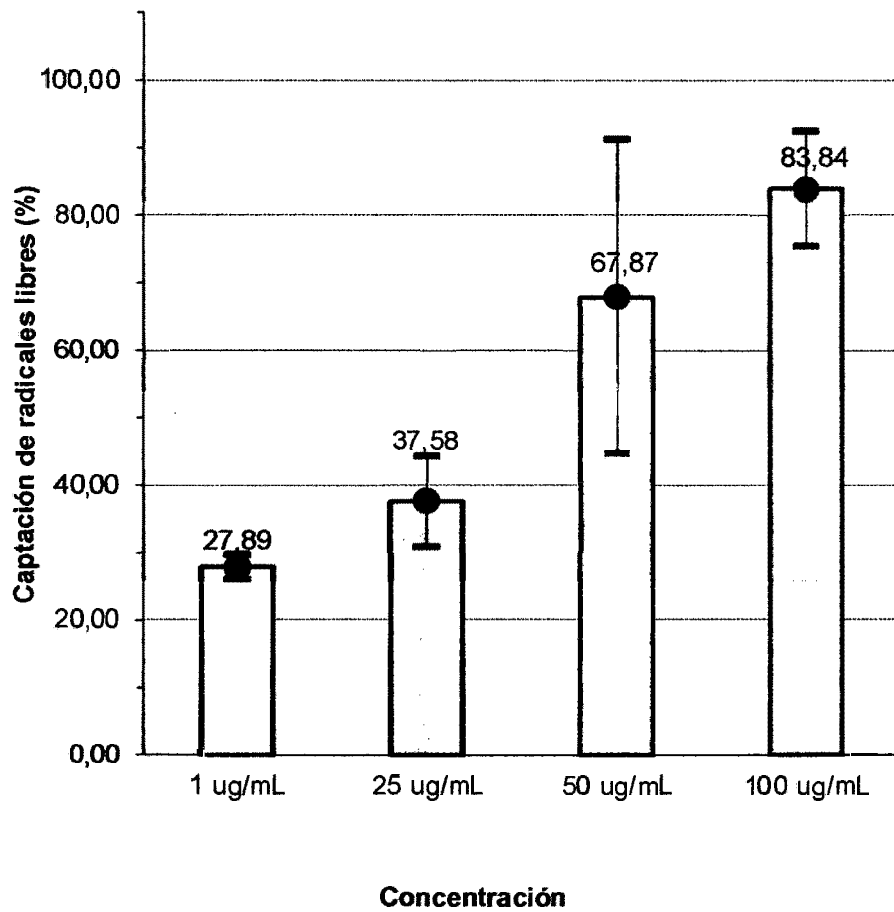
ANVA:  $p < 0,05$ ; Significativo

Figura 1. Porcentaje de captación de radicales libres según las concentraciones de 300 ug/ml del extracto atomizado.



ANVA:  $p < 0,05$ ; Significativo

Figura 2. Porcentaje de captación de radicales libres según las concentraciones de 600 ug/ml del extracto atomizado.



ANVA:  $p < 0,05$ ; Significativo

Figura 3. Porcentaje de captación de radicales libres según las concentraciones de 900 ug/ml del extracto atomizado.

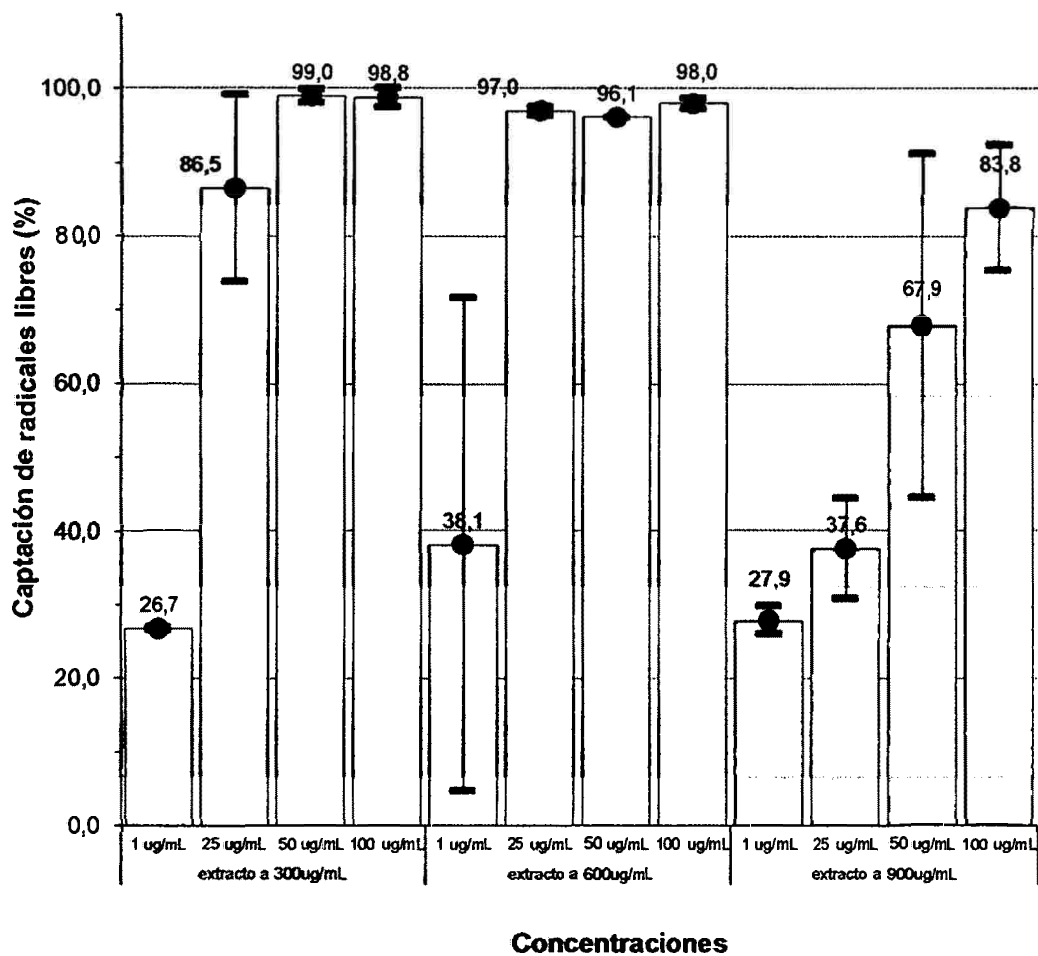


Figura 4. Actividad antioxidante por captación de radicales libres según las diferentes concentraciones del extracto atomizado.

## V. DISCUSIÓN

*Calceolaria rupestris* "romero" es una planta que crece de forma abundante en el centro poblado de Anchac - Wasi (Huaraca) del distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, pertenece al género *Calceolaria* los cuales presentan metabolitos secundarios como Flavonoides, Taninos, que realizan la actividad antioxidante.<sup>4' 5</sup>

En la Tabla 1, se presentan los compuestos químicos identificados del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero" siendo estos los azúcares reductores, catequinas, cumarinas, saponinas, flavonoides, fenoles, taninos, antocianidinas, quinonas, triterpenos y esteroides. Según Limaylla<sup>4</sup> y Del Castillo,<sup>5</sup> identificaron los siguientes metabolitos secundarios flavonoides, taninos, triterpenos y esteroides y quinonas en el género *Calceolaria*. Zavaleta *et al*,<sup>6</sup> refiere que los flavonoides (presentes en el género *Calceolaria*), como los ácidos fenólicos demuestran ser fuertes atrapadores de radicales libres y al mismo tiempo son capaces de inhibir la formación de estos últimos al enlazarse con iones de metales de transición.

De las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero" se obtuvo extracto atomizado con un porcentaje de rendimiento de 9,37%, es decir de 965 g de hojas secas se obtiene 90,58 g de extracto atomizado.

En la Tabla 2, se presentan los parámetros físico - químicos del extracto atomizado con un color marrón claro, un olor *sui generis*, un sabor amargo, aspecto resinoso, solubilidad en etanol y poco soluble en agua, pH de 6,60; humedad de 6,65% y ceniza de 5,19%. Según Kuklinski,<sup>27</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.

El método utilizado para determinar la actividad antioxidante fue de decoloración del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo hidratado), que en solución metanólica es de color violeta intenso y al ser capturado por otras sustancias (antioxidantes) pierde su color característico el mismo que es medido por espectrofotómetro que nos da confianza y seguridad en los resultados.<sup>26</sup>

Para demostrar la actividad antioxidante se trabajó con el extracto atomizado de "romero" a concentraciones de 300 ug/ml; 600 ug/ml y 900 ug/ml. Las cuales fueron preparadas a diferentes diluciones de concentraciones de 1 ug/ml, 25 ug/ml, 50 ug/ml y 100 ug/ml.

En la Figura 1 y Anexo 8, se presentan los porcentajes de inhibición de radicales del extracto atomizado de "romero" a concentración de 300 ug/ml. Se observa que la dilución a la concentración de 50 ug/ml ( $98,99 \pm 0,65$ ) presenta mayor porcentaje de inhibición respecto a las diluciones de concentraciones de 1, 25, 100 ug/ml ( $98,99 \pm 0,09$ ,  $86,52 \pm 6,46$ ,  $98,80 \pm 0,65$  respectivamente); siendo esta variación dependiente de la dilución. Sin embargo, al realizar la prueba de Duncan las diluciones de concentraciones de 1 ug/ml y 25 ug/ml son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ); así mismo la concentración al 50 ug/ml y 100 ug/ml son estadísticamente similares ( $p > 0,05$ )

En la Figura 2 y Anexo 9, se presentan los porcentajes de inhibición de radicales del extracto atomizado de "romero" a concentración de 600 ug/ml, en los cuales se observa que la dilución a la concentración de 100 ug/ml ( $97,97 \pm 0,37$ ) presenta mayor porcentaje de inhibición respecto a las concentraciones de 1; 25 y 50 ug/ml ( $38,13 \pm 17,08$ ;  $96,95 \pm 0,28$ ;  $96,12 \pm 0,00$  respectivamente); siendo esta variación dependiente de la concentración. Sin embargo, al realizar la prueba de Duncan la concentración de 1 ug/ml son estadísticamente diferentes a las concentraciones de 25; 50 y 100 ug/ml ( $p < 0,05$ ); Así mismo la concentración a 25 ug/ml; 50 ug/ml y 100 ug/ml son estadísticamente similares ( $p > 0,05$ ).

En la Figura 3 y Anexo 10, se presentan los porcentajes de inhibición de radicales del extracto atomizado de "romero" a concentración de 900 ug/ml. Se observa que la dilución a la concentración de 100 ug/ml ( $83,84 \pm 4,34$ ) presenta mayor porcentaje de inhibición respecto a las concentraciones de 1; 25; 50 ug/ml ( $27,89 \pm 0,92$ ;  $3,58 \pm 3,42$ ;  $67,87 \pm 11,91$ ) respectivamente; siendo esta variación dependiente de la concentración. Sin embargo, al realizar la prueba de Duncan las diluciones de concentraciones de 1 ug/ml y 25 ug/ml son estadísticamente similares y diferentes a las concentraciones de 50 ug/ml y 100 ug/ml. ( $p > 0,05$ ); así mismo la concentración al 50 ug/ml y 100 ug/ml son estadísticamente similares ( $p > 0,05$ ).

En la Figura 4, se muestra la actividad antioxidante de *Calceolaria rupestris* "romero" según las concentraciones de (300; 600 y 900 mg/ml) y las diluciones a concentración de (1; 25; 50 y 100 ug/ml). Al realizar el análisis factorial, se determina que hay diferencia significativa en las diferentes concentraciones, habiendo variación por la concentración y la dilución a concentraciones (Anexo 13).



En la Figura 4 y Anexo 11, se presentan los resultados obtenidos, se muestra que el extracto atomizado a concentración de 300 ug/ml a una dilución de concentración de 50 ug/ml presentan un mayor porcentaje de inhibición de (99,0 ± 0,46); respecto al extracto atomizado de concentraciones de 300 ug/ml y 600 ug/ml a la dilución de concentraciones de 100; 50 y 25 ug/ml (98,8 ± 0,65; 86,5 ± 6,46; 98,0 ± 0,37; 96,1 ± 0,00; 97,0 ± 0,28); sin embargo según dichos valores son estadísticamente similares de acuerdo al análisis de varianza ( $p > 0,05$ ).

Según Del Solar,<sup>8</sup> en su trabajo sobre la actividad antioxidante de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana* kraenzl "wawillay", Ayacucho – 2012. Que la crema al 0,5% a la concentración de 100 ug/ml presenta 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. Siendo en el extracto atomizado de concentración de 300 ug/ml a la dilución de concentración a 50 ug/ml (98,99 ± 0,65) presentando una mayor actividad de porcentaje de inhibición respecto al extracto de concentraciones de 600 ug/ml y 900 ug/ml que presentaron porcentajes de inhibición de radicales libres de 98,0% y 83,8%

Según Casanova,<sup>7</sup> en su trabajo sobre la actividad antioxidante y antiulcerosa del extracto acuoso liofilizado de *Calceolaria cuneiformis* RLP Subsp. Cuneiformes "ayapa zapatum" determinó que a 125 ug/ml, la absorbancia de 0,128 nm muestra mayor actividad antioxidante y el extracto que muestra menor actividad antioxidante es a 62,5 ug/ml con una absorbancia de 0,278 nm. Siendo en la muestra del extracto atomizado de *Calceolaria rupestris* "romero" la mayor actividad antioxidante a concentración de 300 ug/ml y una dilución de concentración a 50 ug/ml con una absorbancia de 0,027 nm (98,99% de inhibición de radicales libres) y la de menor actividad antioxidante a la

concentración de 900 ug/ml y una concentración de 50 ug/ml con una absorbancia de 0,326 nm (67,87% de inhibición de radicales libres).

Según Harty,<sup>10</sup> en su trabajo sobre *Calceolaria chelidonioides*, planta que pertenece a la familia Scrophulariaceae del cual se aislaron flavonoides: apigenina; quercetina y rutina. La evaluación de la actividad antioxidante mediante el radical libre DPPH mostró el siguiente orden con respecto a las tres moléculas en la reducción de DPPH: apigenina; rutina y quercetina con una concentración inhibitoria (IC<sub>50</sub> en ug/ml= 30,3 ± 1,9; 23,7 ± 2,4 y 18,8 ± 2,1). Siendo en el extracto atomizado de *Calceolaria rupestris* "romero" a una concentración de 300 ug/ml; 600 ug/ml y 900 ug/ml el porcentaje de inhibición de radicales libres DPPH de (98,99 ± 0,46%; 97,97 ± 0,37%; 83,84 ± 4,34%) ya que en el extracto atomizado no se aislaron tipos de flavonoides sino concentraciones con sus respectivas diluciones. Donde el IC es un parámetro introducido recientemente para la interpretación de los resultados del método DPPH, es la concentración eficaz, esta se define como la concentración de sustrato.<sup>28</sup>

Con estos resultados obtenidos en el presente trabajo podemos afirmar que el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* tiene actividad antioxidante.

## VI. CONCLUSIONES

1. Los metabolitos secundarios identificados en el tamizaje fitoquímico del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero" fueron: flavonoides, taninos, fenoles, azúcares reductores, catequinas, quinonas, triterpenos y esteroides.
2. El extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero" tiene un color marrón claro, un olor *sui generis*, un sabor amargo, aspecto resinoso, solubilidad en etanol y poco soluble en agua, pH de 6,60, humedad de 7,02%, cenizas de 5,90% y un rendimiento de 9,37%.
3. Se determinó que el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero", a concentraciones de 300 ug/ml; 600 ug/ml y 900 ug/ml, de diluciones de 1, 25, 50 y 100 ug/ml presentan elevada actividad antioxidante de (99,0 - 83,8%), siendo estas estadísticamente similares hecho que se comprueba al realizar en análisis de varianza.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Realizar estudios farmacológicos del metabolitos secundarios responsables de la actividad antioxidante que se encuentran presentes en el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero"
2. Realizar ensayos cuantitativos de los metabolitos secundarios responsables de la actividad antioxidante presentes en el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero".
3. Realizar formulaciones farmacéuticas como cremas, geles, capsulas debido a que la planta presenta una buena actividad antioxidante.

### VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Buenas Prácticas Agrícolas y de Recolección de Plantas Medicinales. Directrices de un Grupo Científico de la OMS. Ginebra: OMS; 2003.
2. Avello M, Suwalsky M. Antioxidantes Naturales y mecanismos de protección. FONDECYT. Editorial Atenea. 2006. pp. 163 – 164.
3. Festy D. Antioxidantes: Guía práctica ¿Qué son?, ¿Qué funciones realizan?, ¿Qué beneficios aportan? Barcelona: Editorial Robinbook; 2007.
4. Limaylla C. Estudio fitoquímico de *Calceolaria delicatula* Kralg. "ayazapato". Departamento Académico de Ingeniería Química. Ayacucho. UNSCH; 1999.
5. Del Castillo J. Tamizaje fitoquímico, actividad hipoglucemiante y toxicidad aguda de *Calceolaria engleriana* Subsp. *Lutea* molau "ayazapato" [tesis]. Ayacucho. UNSCH; 2002.
6. Zavaleta J, Muñoz A, Blanco T, Alvarado C, Loja B. Capacidad Antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. Horizonte Médico.[revista internet] 2005. [acceso agosto 2012]; 2(5). Disponible en: [www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2005\\_II/Art4\\_Vol5\\_N2.pdf](http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2005_II/Art4_Vol5_N2.pdf)
7. Casanova G. Actividad antioxidante y antiulcerosa del extracto acuoso liofilizado de *Calceolaria cuneiformis* RLP Subsp. *Cuneiformes* "ayapa zapatum" [tesis]. Ayacucho. UNSCH; 2004.
8. 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.
9. Romero M. Evaluación de plantas medicinales con propiedades antioxidantes en los distritos de Ayacucho, Carmen alto y Quinoa de la provincia de Huamanga - Ayacucho. [tesis]. Ayacucho. UNSCH; 2006.
10. Harty M, Falcao D, Menezes F. Flavonoids isolated from *Calceolaria chelidonioides* with antioxidant activity. TCDJPPS. [artículo en internet] 2010. [acceso agosto 2012];1(1): 4-7. Disponible en: URL:<http://www.tcd.ie/pharmacy/assets/pdf/TCDJPPS%20%20February%202010.pdf>.
11. Molau U. Flora Neotrópica: Monograph N°47. Scrophulariaceae. Part 1 Calceolariaceae. The New York Botanical Garden. New York-USA; 1988.
12. Fernandini M, Vera M. Ácido ascórbico en el desarrollo de sarcoma 180 en ratón [tesis]. Lima. UNMSM; 1999.

13. Vicente M, Miñano M. Determinación de algunos antioxidantes en sujetos de altura [tesis]. Lima. UNMSM; 2002.
14. Montero M. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. Universidad Nacional de San Marcos. Anales Facultad de Medicina. 1996.; 57(4): 278 - 251.
15. Avendaño C. Introducción a la Química Farmacéutica. Barcelona: Editorial Mc Graw-Hill Interamericana; 2001.
16. Venereo J. Daño Oxidativo, Radicales libres y Antioxidantes. Revista Cubana Med. Milit. [revista en internet] 2002. [acceso febrero 2013]; 31(2): 126-133. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31\\_2\\_02/MIL09202.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31_2_02/MIL09202.pdf)
17. Velásquez M, Prieto B, Contreras R. El envejecimiento y los radicales libres. Revista Ciencias de la UNAM. [revista en internet]. Julio-setiembre 2004. [acceso diciembre 2012]; 75(1): 36-43. Disponible en: [http://www.alumno.unam.mx/algo\\_leer/Envejecimiento.pdf](http://www.alumno.unam.mx/algo_leer/Envejecimiento.pdf)
18. Rodriguez J, Menéndez J. Trujillo Y. Radicales libres en la biomédica y estrés oxidativo. Rev. Med. Milit "DR. Luís Díaz Soto". Cuba. [revista en internet] 2001. [acceso abril 2013]; 30(1): 36-44. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol30\\_1\\_01/mil07100.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol30_1_01/mil07100.pdf)
19. Maestro R, Borja R. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Revistas Científicas. C.S.I.C. España [revista en internet] 1993. [acceso diciembre 2012]. 42(2): 101-106. Disponible en: [http://www.erevistas.csic.es/ficha\\_articulo.revistas.csic.php](http://www.erevistas.csic.es/ficha_articulo.revistas.csic.php)
20. Avalos A, Pérez E. Metabolismo secundario de las plantas. Serie Fisiología Vegetal de la Universidad Complutense. Madrid. [revista en internet] 2009. [acceso febrero 2013]; 2(3) 119 -145. Disponible en:
21. Villar Del Fresno M. Farmacognosia general. Editorial Síntesis. España. 1999.
22. Nikolai S. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. 1ª ed. Colombia: CYTED. 2000.
23. Miranda M, Cuéllar A. Manual de Prácticas de laboratorio. Farmacognosia y Productos naturales. Instituto de Farmacia y Alimentos. Ciudad de la Habana: Editorial Félix Varela; 2000.
24. 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) DC. "uña de gato". [tesis]. Ayacucho. UNSCH. Ayacucho. 2008.
25. Miranda M. Métodos de análisis de drogas y extractos. La Habana – Cuba; Universidad de la Habana: Instituto de Farmacia y Alimentos. 2002.
26. Castañeda C, Ramos E, Ibañez V. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales: Horizonte Medico [revista en internet]. 2008; [acceso mayo 2012]; 8 (1). Disponible en .  
[http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2008\\_/Art4\\_Vol8\\_N1.pdf](http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2008_/Art4_Vol8_N1.pdf)
27. Kuklinski C. Farmacognosia. 1ª ed. España: Omega; 2000.
28. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Sangklanakarín J. sci. technol. [revista en internet] 2003. [acceso enero 2013]; 26(2): 211 – 219. Disponible en:  
<http://rdo.psu.ac.th/sjstweb-old/journal/26-2/07-DPPH.pdf>

**ANEXO**



Anexo 1



Figura 5. Hojas y Flores de *Calceolaria rupestris*

Anexo 2  
Tabla 3. Constancia de la clasificación taxonómica



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Integración Nacional y el Reconocimiento de Nuestra Diversidad"

**CONSTANCIA N° 225-USM-2012**

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Tallos, hojas y flores), recibida de **Ana María DE LA CRUZ PALOMINO**, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; ha sido estudiada y clasificada como: *Calceolaria rupestris* Molau y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUB CLASE: ASTERIDAE**

**ORDEN: SCROPHYLARIALES**

**FAMILIA: SCROPHYLARIACEAE**

**GENERO: *Calceolaria***

**ESPECIE: *Calceolaria rupestris* Molau**

Nombre vulgar: "Romero".

Determinado por: Mag. María Isabel La Torre (Huber Trinidad).

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 13 de septiembre de 2012



*Haydee Montoya Terreros*  
Dra. HAYDEE MONTÓYA TERREROS  
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Anexo 3

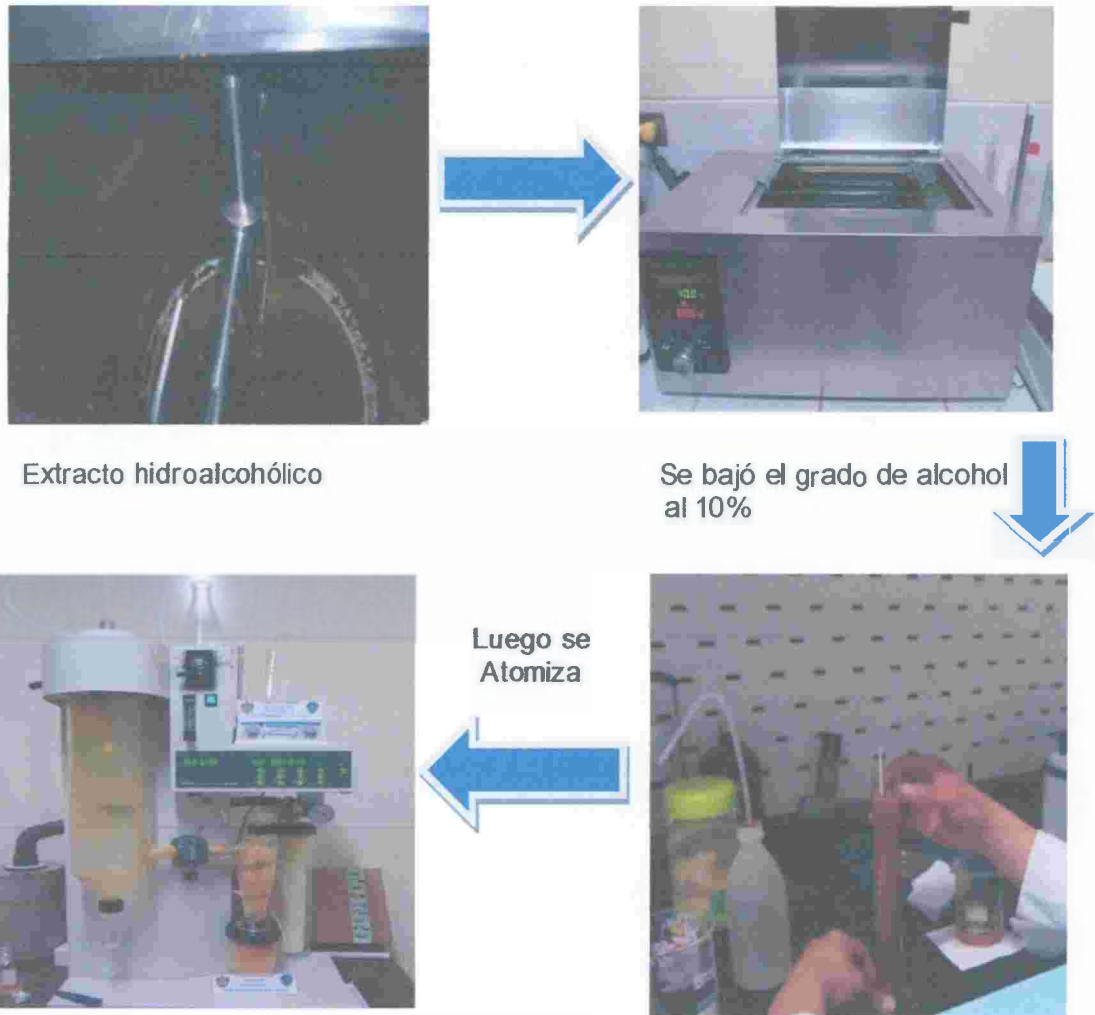


Figura 6. Flujo de procesos para la obtención del extracto hidroalcohólico atomizado

Anexo 4

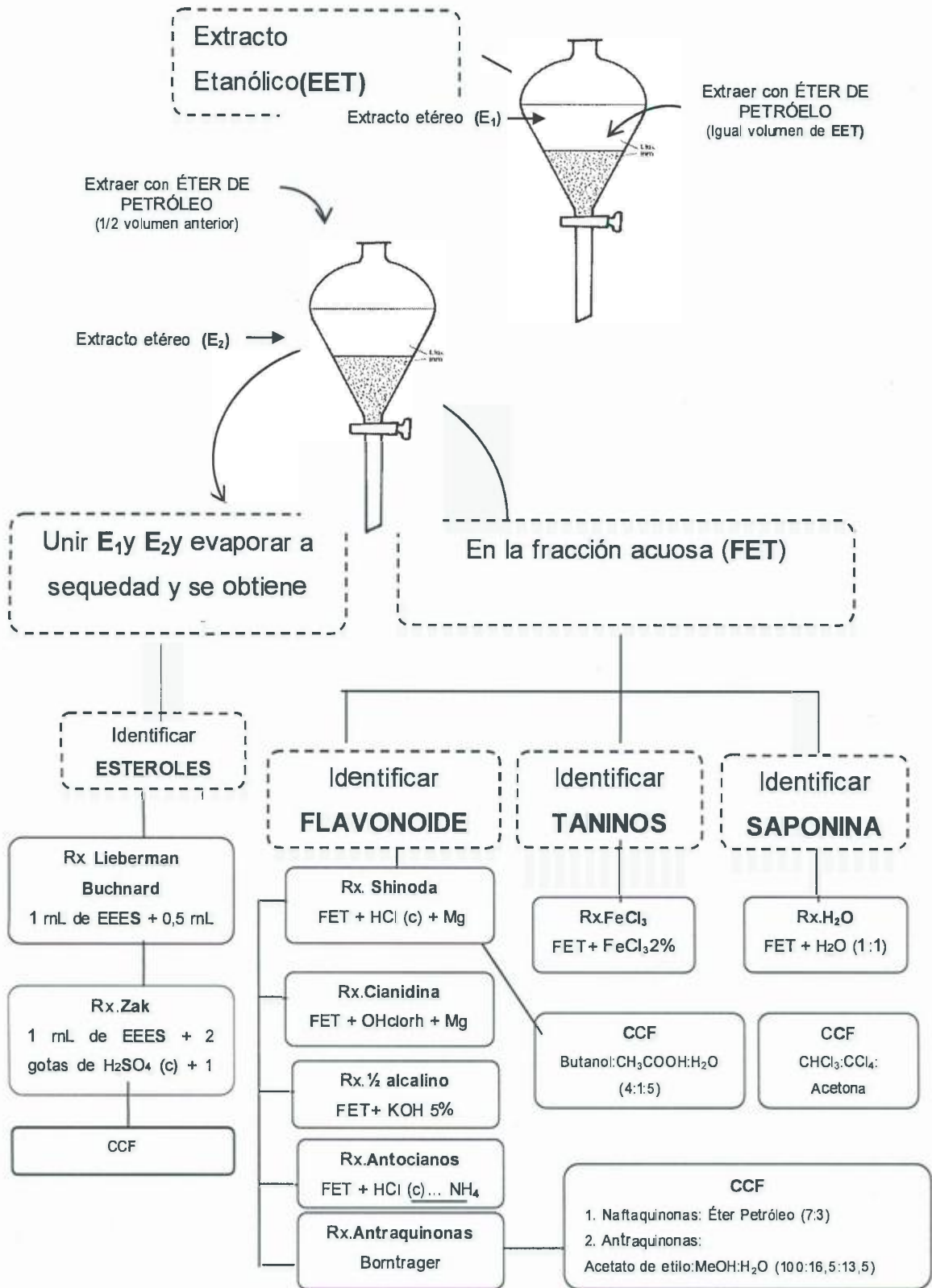


Figura 7. Flujograma de Identificación de metabolitos secundarios

Anexo 5

Tabla 4. Expresiones cualitativas de la solubilidad de la Farmacopea Europea (1993)

Termino descriptivo	Cantidad aproximada de disolvente en volumen por una parte de sustancia en peso
Muy soluble	menos de una parte
Fácilmente soluble	de una a 10 partes
Soluble	de 10 a 30 partes
Bastante soluble (escasamente)	de 30 a 100 partes
Poco soluble	de 100 a 1000 partes
Prácticamente insoluble	más de 10 000 partes

Anexo 6

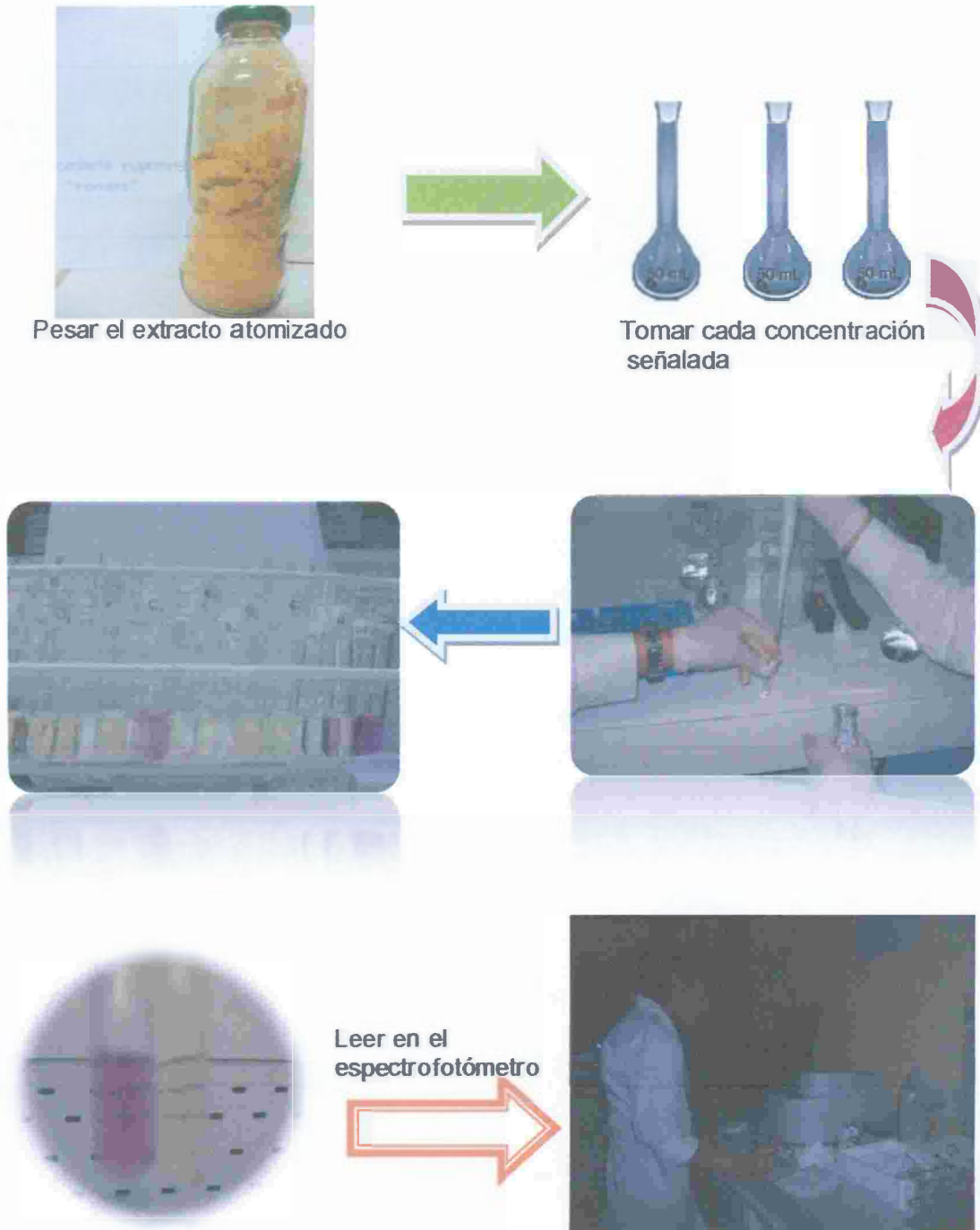


Figura 8. Flujoograma de la determinación de la actividad antioxidante del extracto atomizado

# Actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero", Ayacucho 2012.

Ana María De La Cruz Palomino<sup>1</sup>, Marco Aronés Jara<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Farmacia y Bioquímica: UNSCH

## RESUMEN

Los radicales libres están asociados a muchos procesos patológicos y enfermedades agudas y crónicas, es por eso que se justifica la búsqueda de antioxidantes. *Calceolaria rupestris* es una especie medicinal de uso tradicional que contiene muchos metabolitos secundarios con diversas propiedades biológicas. Por eso, se planteó como objetivo evaluar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero", realizado en los ambientes del Área de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. La muestra fue colectada en la comunidad de Huaraca, anexo del distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, región de Ayacucho. Se obtuvo el extracto hidroalcohólico y fue concentrado por atomización, se determinaron los parámetros físico - químicos del atomizado, como pH, composición química, porcentaje de humedad, porcentaje de cenizas, porcentaje de rendimiento, análisis organoléptico. La actividad antioxidante se determinó por el método de captación del radical libre DPPH, evaluándose a las concentraciones de 300 ug/ml, 600 ug/ml y 900 ug/ml, a diluciones de 1, 25, 50 y 100 ug/ml de cada uno de ellos respectivamente, expresándose los resultados como porcentaje de inhibición. El extracto hidroalcohólico atomizado presentó color marrón claro, olor *sui generis*, sabor amargo, aspecto resinoso, soluble en alcohol etílico y poco soluble en agua, pH 6,60, humedad 6,65%, cenizas 5,19%; con un rendimiento de 9,37%. Los compuestos químicos presentes son flavonoides, taninos, fenoles, azúcares reductores, catequinas, quinonas, triterpenos y esteroides. Los mayores porcentaje de inhibición se obtuvieron a las diluciones de 100 ug/ml, 50 ug/ml y 25 ug/ml de la concentración de 300 ug/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 ug/mL a las diluciones de 100 ug/ml y 25 ug/ml con un  $98,0 \pm 0,37$  y  $97,0 \pm 0,28$  de porcentaje de inhibición respectivamente. No se hallaron diferencias estadísticas entre ellos. Se concluye que a las concentraciones ensayadas del extracto hidroalcohólico atomizado tienen la misma actividad antioxidante.

Palabras clave: Actividad antioxidante, DPPH, extracto atomizado, *Calceolaria rupestris*.

## SUMMARY

Free radicals are associated with many disease processes and acute and chronic diseases, is why the search is justified antioxidant. *Calceolaria cave* is a traditionally used medicinal species containing many secondary metabolites with diverse biological properties. So, was raised as to evaluate the antioxidant activity of hydroalcoholic extract of the leaves sprayed *Calceolaria rupestris* "rosemary", performed in environments Pharmacy Area National University of San Cristobal de Huamanga. The sample was collected in the community of Huaraca Vinchos Annex district, Guamanga Province, Ayacucho region. Hydroalcoholic extract was obtained and was concentrated spray, physical parameters were measured - chemical spray, such as pH, chemical composition, moisture content, ash percentage, organoleptic analysis. The antioxidant activity was determined by the method of harvesting the free radical DPPH, evaluated at concentrations of 300 ug / mi, 600 ug / ml and 900 ug / ml, at dilutions of 1, 25, 50 and 100 ug / ml of each one of them respectively, the results being expressed as percentage inhibition. The hydroalcoholic extract presented atomized light brown, sui generis odor, taste bitter, resinous, soluble in ethyl alcohol and slightly soluble in water, pH 6.60, moisture 6.65%, ash 5.19, with a yield of 9.37. The chemical compounds are flavonoids, tannins, phenols, reducing sugars, catechins, quinones, triterpenoids and steroids. The greatest percent of inhibition was obtained at dilutions of 100 ug / mi, 50 ug / ml and 25 ug / mi concentration of 300 ug / ml of extract with  $98.8 \pm 0.65$ ,  $99.0 \pm 0,46$  and  $86.5 \pm 6.46$  and the concentration of 600 ug / mL to dilutions of 100 ug / mi and 25 ug / mi to  $98.0 \pm 0.37$  and  $97.0 \pm 0.28$  percent inhibition respectively. No statistical differences were found between them. We conclude that the tested concentrations of the hydroalcoholic extract atomized have the same antioxidant activity.

Key words: antioxidant activity, DPPH, atomized extract, *Calceolaria rupestris*

## INTRODUCCIÓN

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>1</sup>

Actualmente la ciencia ha demostrado que los humanos tienen la capacidad de vivir 10 décadas, casi nunca alcanzado, debido a que desconocemos el proceso de envejecimiento, que nos deja vulnerables a las enfermedades que nos restan fortaleza y nuestra total expectativa de vida.<sup>2</sup> Con esta investigación tratamos de aportar en algo el uso del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero".

*Calceolaria rupestris* "romero". Es una especie que pertenece al género *Calceolaria* los cuales presentan metabolitos secundarios como Flavonoides, Taninos, que realizan la actividad antioxidante.<sup>3,4</sup>

Los flavonoides como los ácidos fenólicos han demostrado ser fuertes atrapadores de radicales libres y al mismo tiempo son capaces de inhibir la formación de estos últimos al enlazarse con iones de metales de transición.<sup>5</sup>

Los antioxidantes son un grupo de moléculas reconocida por su capacidad para neutralizar los radicales libres, estas sustancias han surgido como una alternativa para combatir las deficiencias asociadas al estrés oxidativo.<sup>6</sup>

Las investigaciones sobre el estudio de plantas medicinales son reconocidas y de gran importancia para la Organización Mundial de la Salud. Por lo tanto el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero" sirva como una alternativa medicamentosa. Para lo cual se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Evaluar la actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero", Ayacucho 2012.

Objetivos específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero".

- Determinar los parámetros físico-químicos del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero".
- Determinar la actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero".

## MATERIALES Y METODOS

**Población.-** *Calceolaria rupestris* "romero", del centro poblado de Anchac - Wasi (Huaraca) del distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, ubicado a una altura de 3129 msnm.

**Muestra.-** Cinco kg de hojas seleccionadas de *Calceolaria rupestris* "romero", recolectadas durante el mes de junio del 2012, posteriormente se certificó la especie en el Herbario San Marcos (UNMSM) del Museo de Historia Natural, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

**Sistema de muestreo**

Libre por conveniencia

**Tipo de Investigación**

Básica

**Métodos para la recolección de datos**

**Recolección y desecación de las hojas**

La muestra de *Calceolaria rupestris* "romero" se recolectó en estado de madurez en horas de la mañana y transportada en bolsas a los laboratorios de la Escuela de Farmacia. Para su lavado con hipoclorito de sodio y se secaron a temperatura ambiente, en un lugar con buena ventilación, sombreado en tendeles de papel bond, removiendo el vegetal cada 24 horas para evitar su descomposición, por un periodo de cinco a ocho días según las directrices OMS.<sup>1</sup>

**Obtención del extracto hidroalcohólico atomizado**

Luego el secado de la planta se procedió al deshojado de las hojas para ser reducidas de tamaño utilizando el molino de cuchilla y martillo con malla de un cm aprox, hasta obtener un pulverizado uniforme, teniendo cuidado del sobrecalentamiento del molino para evitar la descomposición de algunos constituyentes químicos obteniendo un molido de 965 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>7</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>8</sup>

Finalmente se reunieron todos los líquidos extractivos filtrados, 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.

#### Identificación de compuestos químicos

La identificación de los diferentes compuestos químicos (metabolitos secundarios) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero" fueron realizadas siguiendo los procedimientos de Miranda y Cuéllar.<sup>8</sup>

#### Evaluación de los parámetros fisicoquímicos

Una vez obtenido el extracto atomizado, se evaluaron los parámetros físico-químicos, que a continuación señalamos.<sup>8</sup>

- Determinación de las características organolépticas
- Determinación de la solubilidad
- Determinación de pH
- Determinación del contenido de humedad
- Determinación del contenido de cenizas
- Identificación de compuestos químicos

#### Determinación de la actividad antioxidante

Para la búsqueda de agentes antioxidantes de radicales libres se empleó el bioensayo "in vitro" en donde el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo hidratado (DPPH).<sup>9</sup>

#### Procedimiento

- Se preparó una solución metanólica de DPPH de 20 ug/ml.
- Luego se preparó una solución metanólica del extracto hidroalcohólico atomizado a una concentración de 300 ug/ml (solución A).
- El blanco se preparó con metanol agua 2:1 para ajustar el espectrofotómetro a cero.
- El blanco de muestra se preparó con 0.75 mL de muestra (solución A) y 1,5 ml de metanol
- Se preparó el patrón de referencia con 1.5 ml de DPPH y 0.75 ml de agua.
- La muestra, con 0,75 ml de solución A y 1,5 ml de DPPH obteniéndose una solución final de 100 µg/ml.
- Inmediatamente se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos y se realizó la lectura de la absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro.

- Se midió la absorbancia del patrón de referencia y del blanco de la muestra.

- Luego se diluyó la solución A con metanol en una proporción 1: 1 para obtener una concentración final de 50 ug/mL, en 1:3 para obtener una concentración final de 25 ug/ml y en una proporción de 1:100 para obtener una concentración final de 1 ug/mL.

- Con las soluciones del extracto hidroalcohólico atomizado a 600 ug/ml y 900 ug/ml se procedió igual que en el caso anterior.

Las diluciones a concentraciones de 1,25, 50 y 100 ug/ml se evaluaron por triplicado.

Posteriormente, con los valores de las absorbancias obtenidas se determinó % de captación de radicales libres (DPPH) mediante la siguiente fórmula

$$\%_{(DPPH \text{ inhibición})} = 1 - \left[ \frac{A_2 - A_3}{A_1} \right] \times 100$$

A<sub>1</sub>: Absorbancia del patrón de referencia

A<sub>2</sub>: Absorbancia de la muestra

A<sub>3</sub>: Absorbancia del blanco de la muestra

## RESULTADOS

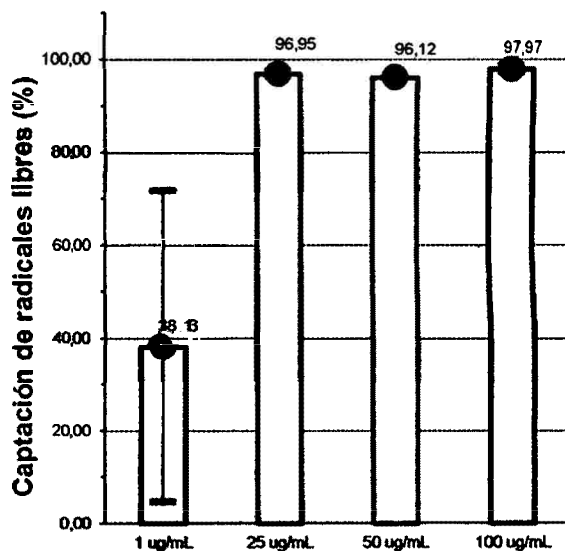
Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en el extracto atomizado

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Catequinas	Catequinas	++	mancha verde carmelita a luz UV
Lactonas y/o Cumarinas	Baljet	++	coloración rojiza
Saponinas	Espuma	++	formación de espuma
Flavonoides	Shinoda	+++	fase amfílica de color amarillo intenso
Fenoles y/o Taninos	Cloruro férico	+++	coloración verde (no son hidrosolubles)
Quinonas	Borntrager	++	fase acuosa alcalina color rojo
Triterpenos y/o Esteroides	Liebermann- Burchard	+	coloración verde oscura
Azúcares reductores	Fehling	+++	precipitado rojo

Leyenda:(-): Ausente (+): Poco  
Bastante (+++): Muy abundante

Tabla 2. Parámetros físico-químicos del extracto atomizado

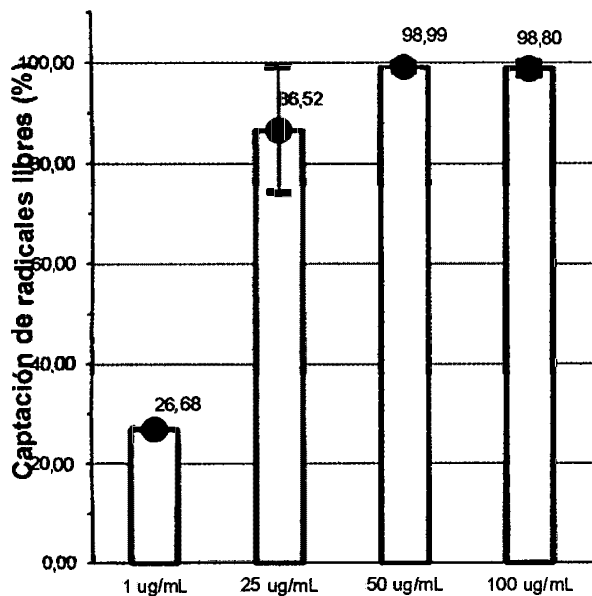
Parámetros	Ensayos	Resultados
<b>organoléptico</b>	color	marrón claro
	olor	<i>sui generis</i>
	sabor	amargo
	aspecto	Resinoso
<b>solubilidad</b>	agua	poco soluble
	alcohol	soluble
pH	agua	6,60
humedad	perdida por desecación	6,65%
cenizas	cenizas totales	5,19%



**Concentración**

ANVA:  $p < 0,05$ ; Significativo

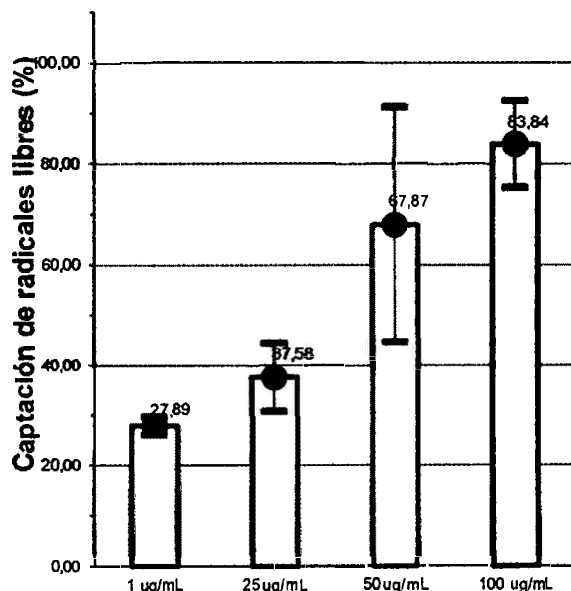
Figura 2. Porcentaje de captación de radicales libres según las concentraciones de 600 ug/ml del extracto atomizado



**Concentración**

ANVA:  $p < 0,05$ ; Significativo

Figura 2. Porcentaje de captación de radicales libres según las concentraciones de 300 ug/ml del extracto atomizado



**Concentración**

ANVA:  $p < 0,05$ ; Significativo

Figura 3. Potcentaje de captación de radicales libres según las concentraciones de 900 ug/ml del extracto atomizado

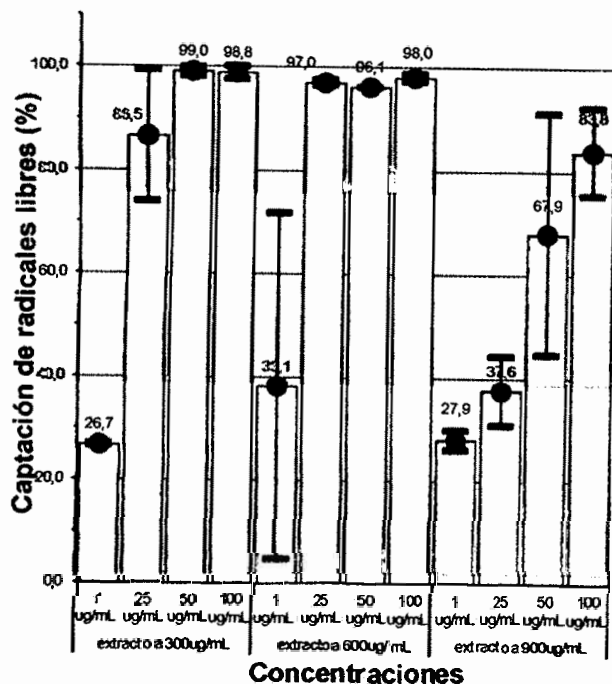


Figura 4. Actividad antioxidante por captación de radicales libres según las diferentes concentraciones del extracto atomizado

### DISCUSIÓN

*Calceolaria rupestris* "romero" es una planta que crece de forma abundante en el centro poblado de Anchac - Wasi (Huaraca) del distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, pertenece al género *Calceolaria* los cuales presentan metabolitos secundarios como Flavonoides, Taninos, que realizan la actividad antioxidante.<sup>4,5</sup>

En la Tabla 1, se presentan los compuestos químicos identificados del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero" siendo estos los azúcares reductores, catequinas, cumarinas, saponinas, flavonoides, fenoles, taninos, antocianidinas, quinonas, triterpenos y esteroides. Según Limaylla<sup>4</sup> y Del Castillo,<sup>5</sup> identificaron los siguientes metabolitos secundarios flavonoides, taninos, triterpenos y esteroides y quinonas en el género *Calceolaria*. Zavaleta et al,<sup>6</sup> refiere que los flavonoides (presentes en el género *Calceolaria*), como los ácidos fenólicos demuestran ser fuertes atrapadores de radicales libres y al mismo tiempo son capaces de inhibir la formación de estos últimos al enlazarse con iones de metales de transición.

De las hojas de *Calceolaria rupestris* "romero" se obtuvo extracto atomizado con un porcentaje de rendimiento de 9,37%, es decir de 965 g de hojas secas se obtiene 90,58 g de extracto atomizado.

En la Tabla 2, se presentan los parámetros físico-químicos del extracto atomizado con un color marrón claro, un olor *stui géneris*, un sabor amargo, aspecto resinoso, solubilidad en etanol y poco soluble en agua, pH de 6,60; humedad de 6,65% y ceniza de 5,19%. Según Kuklinski,<sup>10</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.

El método utilizado para determinar la actividad antioxidante fue de decoloración del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo hidratado), que en solución metanólica es de color violeta intenso y al ser capturado por otras sustancias (antioxidantes) pierde su color característico el mismo que es medido por espectrofotómetro que nos da confianza y seguridad en los resultados.<sup>9</sup>

Para demostrar la actividad antioxidante se trabajó con el extracto atomizado de "romero" a concentraciones de 300 ug/ml; 600 ug/ml y 900 ug/ml. Las cuales fueron preparadas a diferentes diluciones de concentraciones de 1.ug/ml, 25.ug/ml, 50.ug/ml y 100.ug/ml.

En la Figura 1 y Anexo 8, se presentan los porcentajes de inhibición de radicales del extracto atomizado de "romero" a concentración de 300 ug/ml. Se observa que la dilución a la concentración de 50 ug/ml (98,99±0,65) presenta mayor porcentaje de inhibición respecto a las diluciones de concentraciones de 1, 25, 100.ug/ml (98,99±0,09, 86,52±6,46, 98,80±0,65 respectivamente); siendo esta variación dependiente de la dilución. Sin embargo, al realizar la prueba de Duncan las diluciones de concentraciones de 1 ug/ml y 25.ug/ml son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ); así mismo la concentración al 50 ug/ml y 100 ug/ml son estadísticamente similares ( $p > 0,05$ )

En la Figura 2 y Anexo 9, se presentan los porcentajes de inhibición de radicales del extracto atomizado de "romero" a concentración de 600 ug/ml, en los cuales se observa que la dilución a la concentración de 100 ug/ml (97,97±0,37) presenta mayor porcentaje de inhibición respecto a las concentraciones de 1; 25 y 50.ug/ml (38,13±17,08; 96,95±0,28; 96,12±0,00 respectivamente); siendo esta variación dependiente de la concentración. Sin embargo, al realizar la prueba de Duncan la concentración de 1 ug/ml son estadísticamente diferentes a las concentraciones de 25; 50.y.100 ug/ml ( $p < 0,05$ ); Así mismo la concentración a 25

ug/ml; 50 ug/ml y 100 ug/ml son estadísticamente similares ( $p > 0,05$ ).

En la Figura 3 y Anexo 10, se presentan los porcentajes de inhibición de radicales del extracto atomizado de “romero” a concentración de 900 ug/ml. Se observa que la dilución a la concentración de 100 ug/ml ( $83,84 \pm 4,34$ ) presenta mayor porcentaje de inhibición respecto a las concentraciones de 1; 25; 50.ug/ml ( $27,89 \pm 0,92$ ;  $3,58 \pm 3,42$ ;  $67,87 \pm 11,91$ ) respectivamente; siendo esta variación dependiente de la concentración. Sin embargo, al realizar la prueba de Duncan las diluciones de concentraciones de 1 ug/ml y 25.ug/ml son estadísticamente similares y diferentes a las concentraciones de 50 ug/ml y 100 ug/ml. ( $p > 0,05$ ); así mismo la concentración al 50 ug/ml y 100 ug/ml son estadísticamente similares ( $p > 0,05$ ).

En la Figura 4, se muestra la actividad antioxidante de *Calceolaria rupestris* “romero” según las concentraciones de (300; 600 y 900 mg/ml) y las diluciones a concentración de (1; 25; 50 y 100.ug/ml). Al realizar el análisis factorial, se determina que hay diferencia significativa en las diferentes concentraciones, habiendo variación por la concentración y la dilución a concentraciones (Anexo 13).

En la Figura 4 y Anexo 11, se presentan los resultados obtenidos, se muestra que el extracto atomizado a concentración de 300 ug/ml a una dilución de concentración de 50.ug/ml presentan un mayor porcentaje de inhibición de ( $99,0 \pm 0,46$ ); respecto al extracto atomizado de concentraciones de 300.ug/ml y 600.ug/ml a la dilución de concentraciones de 100; 50 y 25.ug/ml ( $98,8 \pm 0,65$ ;  $86,5 \pm 6,46$ ;  $98,0 \pm 0,37$ ;  $96,1 \pm 0,00$ ;  $97,0 \pm 0,28$ ); sin embargo según dichos valores son estadísticamente similares de acuerdo al análisis de varianza ( $p > 0,05$ ).

Según Del Solar,<sup>11</sup> en su trabajo sobre la actividad antioxidante de la crema elaborada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Calceolaria engleriana kraenzl* “wawillay“, Ayacucho – 2012. Que la crema al 0,5% a la concentración de 100.ug/ml presenta mayor porcentaje de inhibición de radicales libres ( $99,46 \pm 0,11$ ), respecto a las cremas al 1,0% y 2,0% que presentaron porcentajes de  $99,10 \pm 0,46\%$  y  $96,45 \pm 0,53\%$  respectivamente. Siendo en el extracto atomizado de concentración de 300 ug/ml a la dilución de concentración a 50.ug/ml ( $98,99 \pm 0,65$ ) presentando una mayor actividad de porcentaje de inhibición respecto al extracto de concentraciones de 600 ug/ml y 900 ug/ml que presentaron porcentajes de inhibición de radicales libres de 98,0% y 83,8%

Según Casanova,<sup>12</sup> en su trabajo sobre la actividad antioxidante y antiulcerosa del extracto acuoso liofilizado de *Calceolaria cuneiformis* RLP Subsp. Cuneiformes “ayapa zapatum” determinó que a 125 ug/ml, la absorbancia de 0,128 nm muestra mayor actividad antioxidante y el extracto que muestra menor actividad antioxidante es a 62,5 ug/ml con una absorbancia de 0,278 nm. Siendo en la muestra del extracto atomizado de *Calceolaria rupestris* “romero” la mayor actividad antioxidante a concentración de 300 ug/ml y una dilución de concentración a 50.ug/ml con una absorbancia de 0,027 nm (98,99% de inhibición de radicales libres) y la de menor actividad antioxidante a la concentración de 900 ug/ml y una concentración de 50 ug/ml con una absorbancia de 0,326 nm (67,87% de inhibición de radicales libres).

Según Harty,<sup>13</sup> en su trabajo sobre *Calceolaria chelidonioides*, planta que pertenece a la familia Scrophulariaceae del cual se aislaron flavonoides: apigenina; quercetina y rutina. La evaluación de la actividad antioxidante mediante el radical libre DPPH mostró el siguiente orden con respecto a las tres moléculas en la reducción de DPPH: apigenina; rutina y quercetina con una concentración inhibitoria ( $IC_{50}$  en ug/ml=  $30,3 \pm 1,9$ ;  $23,7 \pm 2,4$  y  $18,8 \pm 2,1$ ). Siendo en el extracto atomizado de *Calceolaria rupestris* “romero” a una concentración de 300 ug/ml; 600.ug/ml y 900 ug/ml el porcentaje de inhibición de radicales libres DPPH de ( $98,99 \pm 0,46\%$ ;  $97,97 \pm 0,37\%$ ;  $83,84 \pm 4,34\%$ ) ya que en el extracto atomizado no se aislaron tipos de flavonoides sino concentraciones con sus respectivas diluciones. Donde el IC es un parámetro introducido recientemente para la interpretación de los resultados del método DPPH, es la concentración eficaz, esta se define como la concentración de sustrato.<sup>14</sup>

Con estos resultados obtenidos en el presente trabajo podemos afirmar que el extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria rupestris* tiene actividad antioxidante.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Buenas Prácticas Agrícolas y de Recolección de Plantas Medicinales. Directrices de un Grupo Científico de la OMS. Ginebra: OMS; 2003.
2. Avello M, Suwalsky M. Antioxidantes Naturales y mecanismos de protección. FONDECYT. Editorial Atenea. 2006. pp. 163 – 164.

3. Festy D. Antioxidantes: Guía práctica ¿Qué son?, ¿Qué funciones realizan?, ¿Qué beneficios aportan? Barcelona: Editorial Robinbook; 2007.
4. Limaylla C. Estudio fitoquímico de Calceolaria delicatula Kralg. “ayazapato”. Departamento Académico de Ingeniería Química. Ayacucho. UNSCH; 1999.
5. Del Castillo J. Tamizaje fitoquímico, actividad hipoglucemiante y toxicidad aguda de Calceolaria engleriana Subsp. Lutea molau “ayazapato” [tesis]. Ayacucho. UNSCH; 2002.
6. Zavaleta J, Muñoz A, Blanco T, Alvarado C, Loja B. Capacidad Antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. Horizonte Médico.[revista internet] 2005. [acceso agosto 2012]; 2(5). Disponible en: [www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2005\\_II/Art4\\_Vol5\\_N2.pdf](http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2005_II/Art4_Vol5_N2.pdf)
7. Nikolai S. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. 1ª ed. Colombia: CYTED. 2000.
8. Miranda M, Cuéllar A. Manual de Prácticas de laboratorio. Farmacognosia y Productos naturales. Instituto de Farmacia y Alimentos. Ciudad de la Habana: Editorial Félix Varela; 2000
9. Castañeda C, Ramos E, Ibañez V. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales: Horizonte Medico [revista en internet]. 2008; [acceso mayo 2012]; 8 (1). Disponible en: [http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2008\\_I/Art4\\_Vol8\\_N1.pdf](http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2008_I/Art4_Vol8_N1.pdf)
10. Kuklinski C. Farmacognosia. 1ª ed. España: Omega; 2000.
11. 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.
12. Casanova G. Actividad antioxidante y antiulcerosa del extracto acuoso liofilizado de Calceolaria cuneiformis RLP Subsp. Cuneiformes “ayapa zapatum” [tesis]. Ayacucho. UNSCH; 2004.
13. Harty M, Falcao D, Menezes F. Flavonoids isolated from Calceolaria chelidonioides with antioxidant activity. TCDJPPS. [artículo en internet] 2010. [acceso agosto 2012];1(1): 4-7. Disponible en: [URL:http://www.tcd.ie/pharmacy/assets/pdf/TCDJPPS%20%20February%202010.pdf](http://www.tcd.ie/pharmacy/assets/pdf/TCDJPPS%20%20February%202010.pdf)
14. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Sangklanakarín J. sci. technol. [revista en internet] 2003. [acceso enero 2013]; 26(2): 211 – 219. Disponible en: <http://rdo.psu.ac.th/sjstweb-old/journal/26-2/07-DPPH.pdf>